

# **Efeitos agudos do cloreto de mercúrio sobre a vasculatura renal de ratos**

**João Vitor dos Anjos Vieira**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, 2018

# **Efeitos agudos do cloreto de mercúrio sobre a vasculatura renal de ratos**

**João Vitor dos Anjos Vieira**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Fisiológicas  
da Universidade Federal do Espírito  
Santo como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Fisiológicas

Aprovada em \_\_\_\_/ \_\_\_\_ / 2018 por:

**Prof. Dr. Leonardo dos Santos**  
Orientador, UFES

**Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo**  
Coorientador, UFES

**Profa. Dra. Carmen Luiza Sartório**  
Membro interno PPGCF, UFES

**Profa. Dra. Adriana Castello Costa Girardi**  
Membro externo, InCOR-FMUSP

**Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, 2018

**Vieira, João Vitor dos Anjos 1992**

**Efeitos agudos do cloreto de mercúrio sobre a vasculatura renal de ratos**

[Vitória] 2018

p. 66, 29,7 cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2018)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos

1 Mercúrio; 2 Rim; 3 Hemodinâmica renal; 4 Reatividade vascular; 5 Endotélio; 6 Óxido nítrico; 7 Músculo liso.

A Deus, pela condição que me deu para chegar até aqui, e aos meus amados pais Lidia Araujo dos Anjos Vieira e João Carlos Vieira pelo amor, atenção, dedicação, carinho, zelo, cuidado e infinitas coisas mais que me proporcionaram durante a minha vida. Sou e serei eternamente grato.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por seu imensurável amor, pelas oportunidades que me concedeu, pelas pessoas que colocou no meu caminho para me ajudar e auxiliar a conquistar vitórias e alcançar os meus sonhos, pelas maravilhosas bênçãos que me conferiu e por tudo o que fizeste por mim.

Aos meus amados pais, Lidia e João Carlos, por guiarem os meus primeiros passos, por me educarem e concederem tudo aquilo que precisei para chegar até aqui, pelo carinho, amor, proteção, zelo, dedicação, preocupação, e tudo aquilo que um pai e uma mãe podem oferecer de melhor ao seu filho. A minha família querida [primos(as), tios(as), avôs(ós)] pelo apoio, pelos momentos felizes e tristes, que me trouxeram experiências marcantes e ao mesmo tempo maravilhosas. Ao meu amor, Larissa B. de Oliveira, pelo amor, carinho, companheirismo e suporte nesses quase dois anos junto.

Ao Prof. Dr. Dalton V. Vassallo e Profa. Dra. Ivanita Stefanon, por terem me concedido a oportunidade de frequentar o Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular (LEMC) no ano de 2012 durante a graduação, e assim poder participar das atividades do laboratório. Ao professor e orientador Dr. Leonardo dos Santos por ter me dado a oportunidade no ano de 2013 de demonstrar o meu trabalho e dedicação nos experimentos e estudos, e por toda a ajuda que me concedeu no decorrer da graduação e da pós-graduação. Pela confiança e credibilidade que depositou na minha pessoa, sou e serei grato. A Profa. Dra. Adriana C. Girardi que me proporcionou a oportunidade de conhecer o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCO<sub>R</sub> – FMUSP. Ao Renato O. Crajoinas, Flávia L. Martins e Acaris B. dos Santos que me auxiliaram nos experimentos e fizeram companhia durante minha permanência em São Paulo. A adorável Profa. Dra. Maria Heloisa M. Shimizu (Helô) que me ajudou a realizar os experimentos nos animais *in vivo* e proporcionou maravilhosos dias de intenso trabalho sempre com muito humor. A todos os iniciantes científicos, mestres, doutores e pós-doutores do LEMC pelo suporte e apoio durante a graduação e pós-graduação. A todos os professores que compartilharam informações e conhecimentos no decorrer da minha formação, e que me auxiliaram a ser um melhor aluno e profissional.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a semear, cultivar e colher os frutos desses anos de curso, de experiências e de aprendizado.

*“Sonhe e ouse sonhar.  
Você nunca irá além dos seus sonhos.”*

(Douglas Carvalho)

## RESUMO

Inúmeros estudos já foram realizados com o objetivo de investigar as modificações decorrentes de intoxicação por mercúrio nos diversos sistemas do corpo humano. Com isso, temos cada vez mais assegurado que a exposição ao mercúrio, mesmo em baixas concentrações, é considerada um fator de risco à saúde humana. O rim, órgão de suma importância na função depuradora e na homeostase dos líquidos corpóreos, é um dos mais afetados nas intoxicações por esse metal, embora pouco se saiba a respeito dos seus impactos diretos sobre a hemodinâmica renal. Com base nessas informações, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da infusão aguda de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) em tempos e concentrações diferentes sobre o leito vascular renal isolado, e os efeitos agudos da injeção de  $\text{HgCl}_2$  sobre a função renal de ratos. Para tanto, o rim esquerdo de ratos Wistar foi canulado pela artéria renal, retirado e acondicionado em sistema de perfusão para avaliação da reatividade do leito vascular renal. Uma vez que o fluxo fora mantido constante por meio de bomba peristáltica, as variações na pressão de perfusão indicavam mudanças na resistência vascular ( $P = F \times R$ ). Foram feitas infusões de solução nutriente de Krebs-Henseleit (KH) somente ou contendo  $\text{HgCl}_2$  a 3, 30 ou 300 nM por 30 ou 90 minutos, sendo feitos os protocolos experimentais em seguida. O mercúrio aumentou a pressão de perfusão média (PPM) a partir de 30 min somente com  $\text{HgCl}_2$  300 nM tendo maior elevação aos 90 min. Diminuiu a resposta vasodilatadora à acetilcolina e diminuiu a resposta vasoconstritora à fenilefrina de maneira tempo e concentração-dependente. Aumentou a resposta pressórica em função do aumento do fluxo (relação fluxo-pressão) após 30 e 90 min de perfusão a 300 nM. A perfusão por 90 min com  $\text{HgCl}_2$  cursou com depósitos de mercúrio proporcional a concentração utilizada, principalmente no córtex renal. Nos experimentos *in vivo*, a injeção com  $\text{HgCl}_2$  (0,0656 mg/kg) reduziu o fluxo sanguíneo renal e aumentou a resistência vascular renal, diminuiu a taxa de filtração glomerular; aumentou a diurese e a fração excretada de água. Estes resultados ajudam a esclarecer os mecanismos pelos quais o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o sistema renal, modificando sua vasculatura e, assim, a hemodinâmica renal.

**Palavras-chave:** Mercúrio; rim; hemodinâmica renal; endotélio vascular; intoxicação; reatividade vascular.

## ABSTRACT

Several studies have already been carried to investigate toxic effects of mercury exposure in different systems of the body. There are sufficient evidences showing that, even at low levels, mercury exposure is considered a risk factor for human health. The kidney, an organ of unique importance for *clearance* and homeostasis of the body fluids, is one of the most affected in mercury intoxication, although little is known about its direct impacts on renal vasculature. Thus, we aimed to evaluate the effects of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) infused at different times and concentrations on the isolated renal vascular bed *in vitro*, and the acute effects of HgCl<sub>2</sub> intravenous injection on the *in vivo* renal function of rats. For this, the left kidney of Wistar rats was cannulated by the artery, removed and conditioned in a perfusion system to evaluate vascular reactivity. Since the flow was kept constant by means of peristaltic pump, changes in perfusion pressure indicated changes in vascular resistance ( $P = F \times R$ ). Experimental protocols were done after infusions of nutrient Krebs-Henseleit solution alone (as controls) or containing HgCl<sub>2</sub> at 3, 30 or 300 nM for 30 or 90 minutes. Mercury continuously increased the perfusion pressure only with 300 nM HgCl<sub>2</sub> starting from 30 until 90 min; decreased vasodilatation to acetylcholine and decreases vasoconstriction to phenylephrine in a time-and concentration-dependent manner; and increased the perfusion pressure rising as a function of increased flows (flow-pressure curves) after 30 and 90 min of perfusion at 300 nM. The 90 min infusion with HgCl<sub>2</sub> cursed with Hg deposits proportional to the concentration used, mainly in the renal cortex. In the *in vivo* experiments, HgCl<sub>2</sub> injection (0,0656 mg/kg) reduced renal blood flow and increased renal vascular resistance, decreased glomerular filtration rate, and increased diuresis and excreted water fraction. These results help to clarify the mechanisms by which mercury exerts toxic effect on the renal system, modifying its vasculature and then hemodynamics.

**Keywords:** Mercury; kidney; renal hemodynamics; vascular endothelium; intoxication; vascular reactivity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Processo de emissão e bioacumulação do mercúrio nos ecossistemas...	18
<b>Figura 2.</b> Ciclo global do mercúrio.....	18
<b>Figura 3.</b> Baía de Minamata e Rio Doce contaminado com metais pesados .....	19
<b>Figura 4.</b> Efeitos das alterações no tônus das arteríolas aferentes e eferentes na TFG, FPR, $P_{GC}$ , FF e resistência.....	30
<b>Figura 5.</b> Efeito do tempo de experimento na resposta à fenilefrina e acetilcolina...	34
<b>Figura 6.</b> Registro com indicação dos protocolos experimentais.....	36
<b>Figura 7.</b> Efeito do tempo e concentração de mercúrio sobre a PPM.....	41
<b>Figura 8.</b> Efeitos do mercúrio sobre a vasodilatação endotélio-dependente.....	42
<b>Figura 9.</b> Curva fluxo x pressão no leito vascular renal .....	43
<b>Figura 10.</b> Resposta contrátil induzida por fenilefrina .....	44
<b>Figura 11.</b> Teor de mercúrio depositado na medula e no córtex renal .....	45
<b>Figura 12.</b> Efeitos agudos do cloreto de mercúrio na pressão arterial, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal de ratos anestesiados.....	46
<b>Figura 13.</b> Efeitos agudos do cloreto de mercúrio sobre a função renal.....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

**ACh** - Acetilcolina

**Angio II** - Angiotensina II

**CCS** - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo

**C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>HgCl** - Cloreto de etilmercúrio

**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg<sup>+</sup>** - Dimetilmercúrio

**CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>** - Metilmercúrio

**Cl<sub>Inulina</sub>** - *Clearance* de inulina

**Cl<sup>-</sup>** - Cloreto

**CONCEA** - Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

**COX** - Ciclooxigenase

**Ct** - Controle

**EDHF** - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

**EPA** - Agência de Proteção Ambiental dos EUA

**EPM** - Erro padrão da média

**EROs** - Espécies reativas de oxigênio

**FC** - Frequência cardíaca

**FE** - Fenilefrina

**FEH<sub>2</sub>O** - Fração de excreção de água

**FSR** - Fluxo sanguíneo renal

**g** - Grama

**h** - Hora

**Hg<sup>2+</sup>** - Íon mercúrico

**Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup> ou Hg<sup>1+</sup>** - Íon mercuroso

**H<sub>2</sub>O** - Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**Hg** - Mercúrio

**HgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de mercúrio

**Hg(CNO)<sub>2</sub>** - Fulminato de mercúrio

**HgS** - Sulfeto de mercúrio

**ICP-MS** - Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

**Kg** - Kilo

**KH** - Krebs-Henseleit

**L** - Litro

**M** - Molar

**mg** - Miligrama

**mL** - Mililitro

**MLV** - Músculo liso vascular

**mM** - Milimolar

**NADPH** - Adenina dinucleotídeo fosfato

**Na<sup>+</sup>** - Sódio

**nM** - Nanomolar

**NO** - Óxido nítrico

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion superóxido

**OAT 1 e 3** - Transportadores aniônicos orgânicos

**OH<sup>-</sup>** - Radical hidroxila

**OONO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**PAM** - Pressão arterial média

**PGH<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>** - Prostaglandinas H<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub>

**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**PPM** - Pressão de perfusão média

**RVR** - Resistência vascular renal

**-SH** - Grupamento tiol

**SOD** - Enzima superóxido dismutase

**TFG** - Taxa de filtração glomerular

**TXA<sub>2</sub>** - Tromboxano A<sub>2</sub>

**VU** - Volume urinário

**°C** - Graus célsius

**μg** - Micrograma

**μL** - Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO MERCÚRIO	15
1.2 ASPECTOS QUÍMICOS E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO	15
1.3 O MERCÚRIO COMO AGENTE TÓXICO	17
<b>1.3.1 Poluente ambiental</b>	17
<b>1.3.2 Mecanismos de transporte e toxicidade</b>	20
1.4 EFEITOS TÓXICOS DO MERCÚRIO SOBRE SISTEMAS ORGÂNICOS	22
<b>1.4.1 Efeitos tóxicos sobre o sistema renal</b>	22
<b>1.4.2 Efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular</b>	24
1.5 CONTROLE DO TÔNUS VASCULAR	26
<b>1.5.1 Papel do endotélio vascular</b>	26
<b>1.5.2 Espécies reativas do oxigênio e função vascular</b>	27
1.6 CIRCULAÇÃO RENAL	28
1.7. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	32
3.2 EFEITOS AGUDOS DO HgCl <sub>2</sub> NO RIM ISOLADO E PERFUNDIDO	32
<b>3.2.1 Procedimentos cirúrgicos para retirada do rim</b>	32
<b>3.2.2 Protocolos experimentais <i>in vitro</i></b>	33
<b>3.2.3 Parâmetros de reatividade vascular analisados</b>	35
<b>3.2.4 Teor de mercúrio depositado no rim isolado e perfundido</b>	36
3.3 EFEITOS AGUDOS DA INJEÇÃO DE HgCl <sub>2</sub> NA HEMODINÂMICA E FUNÇÃO RENAL DE RATOS ANESTESIADOS	37
<b>3.3.1 Procedimentos cirúrgicos</b>	37
<b>3.3.2 Protocolos experimentais</b>	38
<b>3.3.3 Parâmetros funcionais analisados</b>	38
3.4 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS	39
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E REPRESENTAÇÃO DOS DADOS	40
<b>4. RESULTADOS</b>	41
4.1 PRESSÃO DE PERFUSÃO MÉDIA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO	41

4.2 RESPOSTA VASODILATADORA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO	41
4.3 RELAÇÃO ENTRE FLUXO E PRESSÃO NO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO .....	42
4.4 RESPOSTA VASOCONSTRITORA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO .....	44
4.5 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO NO RIM PERFUNDIDO COM HgCl <sub>2</sub> .....	45
4.6 ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL NO ANIMAL <i>IN VIVO</i> .....	46
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO MERCÚRIO

O termo “metais pesados” compreende aqueles metais de alto/médio peso molecular como cobre, cádmio, prata, arsênio, cromo, estanho, selênio, antimônio, chumbo e mercúrio, que são tóxicos em concentrações relativamente baixas. O uso de metais pesados como, por exemplo, o mercúrio, está ligado à história dos seres humanos há mais de 2.500 anos, quando se utilizava o cinábrio (sulfeto de mercúrio) para desenhar nas paredes das cavernas e realizar pinturas faciais (HYLANDER et al., 2003; CLARKSON et al., 2007; EKINO et al., 2007).

A palavra mercúrio cujo símbolo é o Hg tem origem do latim “*hydrargyrum*” (*hydro* – água, *argyros* – prata, prata líquida). Foi descoberto na Grécia antiga e classificado como metal a partir do século XVIII, e reconhecido como elemento químico por Antoine Laurent Lavoisier, pai da química moderna (AZEVEDO, 2003).

### 1.2 ASPECTOS QUÍMICOS E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO

O mercúrio é um elemento químico de número atômico 80 (80 prótons e 80 elétrons) e massa atômica 200,59 u. É um dos seis elementos que se apresentam líquidos à temperatura ambiente ou a temperaturas próximas; pertence ao grupo (ou família) 12 (anteriormente chamada 2B) e faz parte da classe dos metais de transição (GOLDWATER, 1972). No que diz respeito a sua categorização, o mercúrio é classificado em três principais formas químicas: elementar, orgânico e inorgânico. Os orgânicos também chamados de organometálicos, são originados da ligação covalente entre o mercúrio e o carbono; enquanto os inorgânicos, da junção do mercúrio com cloro, enxofre ou oxigênio (HSDB, 2004).

O mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) se encontra na forma líquida e gasosa. Na forma líquida, é pouco absorvido e representa pequeno risco à saúde. Na forma de gás é rapidamente absorvido através dos pulmões por ser volátil, sendo que 80% do vapor de mercúrio inalado é retido no organismo (ATSDR, 1999; CLARKSON et al., 2007; HOUSTON, 2007). Por possuir expansão volumétrica uniforme, alta tensão

superficial e não possuir aderência às superfícies vítreas é utilizado em colunas de esfigmomanômetro e termômetros (AZEVEDO, 2016). Por possuir baixa resistência elétrica e alta condutividade térmica é empregado em materiais eletroeletrônicos. Devido ao seu alto poder de oxidação é também utilizado em operações eletroquímicas como na indústria de cloro e soda. Devido à facilidade de formação de amálgamas com outros metais, é utilizado na indústria metalúrgica, na odontologia e no garimpo (MICARONI et al., 2000). É muito utilizado na indústria de produção de cloro-soda, onde para cada tonelada fabricada, aproximadamente 250 g de mercúrio é lançado no meio ambiente, totalizando dezenas de toneladas ao ano em todo o mundo (FISHBEIN, 1971).

O mercúrio orgânico é encontrado em compostos de mercúrio que possuem uma ligação covalente a um átomo de carbono. Trata-se de um grupo bastante heterogêneo, cuja potência varia de um composto para outro. É originado da biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}^+$ ) ou cloreto de etilmercúrio ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$ ), sendo estas as formas mais nocivas (JOHNSON, 2004). São mais absorvidos através do trato gastrointestinal do que os inorgânicos, pois possuem maior solubilidade em lipídios e exercem ação corrosiva menos intensa sobre a mucosa do intestino. Já foram usados em pesticidas, antissépticos, diuréticos, desinfetantes e fungicidas (WHO, 1990; FDA, 2001).

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado na forma oxidada de íon mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$  ou  $\text{Hg}^{1+}$ ) ou íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Além desses, pode ser encontrado em diferentes estados quando combinado com outros elementos químicos, dentre eles se destacam o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), que é altamente tóxico e corrosivo; o cloreto mercurioso ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ); o sulfeto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ) que possui coloração vermelha e devido a isso é utilizado como pigmento de tintas; e o fulminato de mercúrio ( $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ ) utilizado como detonador em explosivos (HSDB, 2004). Já foi utilizado no tratamento da sífilis e também como antisséptico, purgante e diurético, bem como em corantes na produção de tintas utilizadas na proteção de cascos de navios e na confecção de amálgama dentário (WHO, 1991).

## 1.3 O MERCÚRIO COMO AGENTE TÓXICO

### 1.3.1 Poluente ambiental

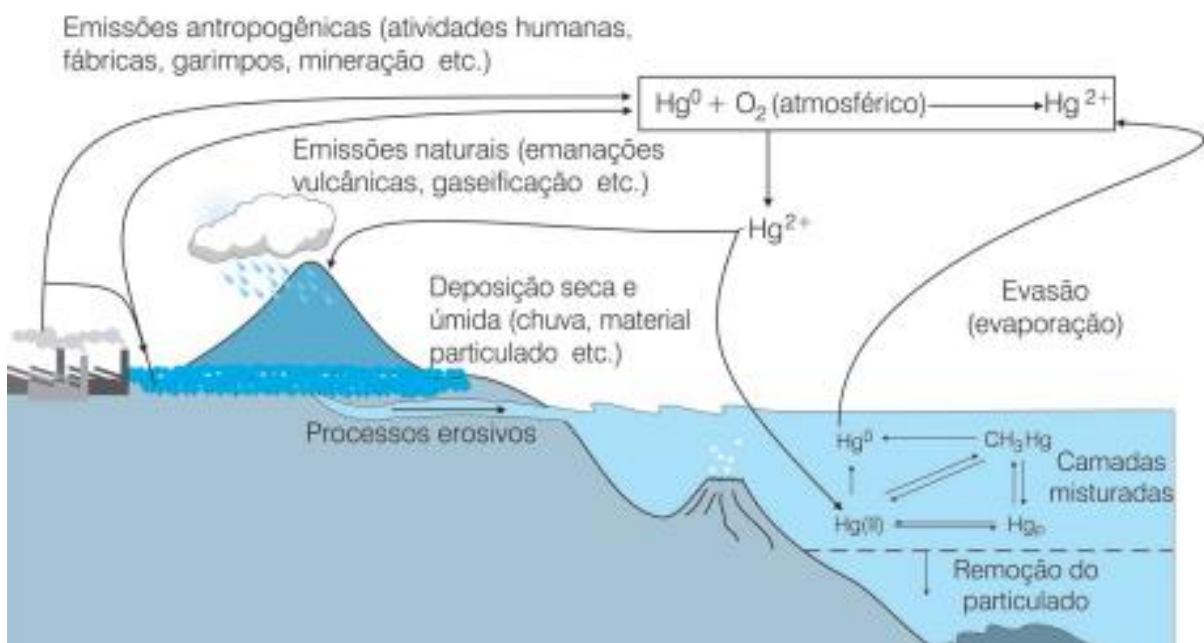
Segundo Alexandre (2006), o mercúrio é considerado como um poluente ambiental de alto risco à saúde pública devido a sua elevada toxicidade e mobilidade nos ecossistemas (Figura 1). Sua exposição pode ocorrer por meio de origens naturais, como, por exemplo, liberação de gás da crosta terrestre, evaporação dos oceanos e queima de combustível fóssil; e artificiais, como, por exemplo, produzido por mineradoras, refinarias, indústria de cosméticos, despolpamento de madeira, amálgama dentário, hospitais, medicamentos, entre outros (WHO, 1990; VASSALO et al., 1996; DAVIDSON et al., 2006; LINDBERG et al., 2007). O mercúrio, uma vez despejado no ambiente, não pode ser destruído e é altamente reativo do ponto de vista químico, o que explica a dificuldade de encontrá-lo em estado puro na natureza. Quando lançado em rios, é absorvido pelos tecidos dos animais e vegetais. Uma vez que os rios deságuam no mar, este poluente pode alcançar as águas salgadas e, em parte, depositar-se no leito oceânico. Além disso, este metal contido nos tecidos dos organismos vivos que habitam os mares acaba também se depositando nos sedimentos, representando um estoque permanente de contaminação para a fauna e a flora aquática e, conseqüentemente, causando a morte de espécies ou a bioacumulação, o que potencializa o efeito nocivo desta substância através das cadeias alimentares. O mercúrio também se deposita no solo ou em corpos d'água de regiões mais distantes, graças à movimentação das massas de ar. Assim, ele pode se acumular em todos os organismos que constituem a cadeia alimentar do homem (MENDONÇA, 2010).





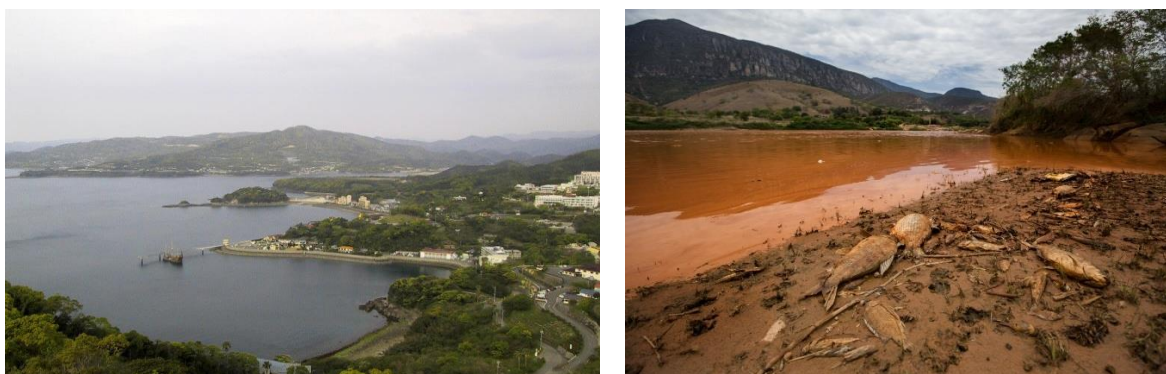
**Figura 1:** Processo de emissão até a bioacumulação do mercúrio nos ecossistemas. Fonte: Própria (2018).

Acerca do ciclo do mercúrio no meio ambiente, tanto a Agência de Proteção Ambiental dos EUA - EPA (1997) quanto Boening e colaboradores (2000), mostram que, compreende desde a sua emissão por meio de processos naturais ou artificiais, até a sua circulação atmosférica por meio de seus vapores e pela precipitação que ocorre com as chuvas, realizando o seu retorno às terras e águas (Figura 2).



**Figura 2:** Ciclo global do mercúrio (SOUZA, 2000).

Por causa de sua alta toxicidade, a exposição ao mercúrio tem trazido efeitos maléficos à saúde humana desde os tempos antigos, todavia as alterações resultantes da exposição dos seres humanos ao mercúrio só atraíram a atenção da sociedade científica após eventos trágicos que marcaram o mundo. Um exemplo claro foi o acidente em Minamata na década de 1950, no Japão, o qual causou a contaminação das águas e dos animais marinhos pelos dejetos de resíduos industriais (metilmercúrio, a espécie mais tóxica do mercúrio) lançados na baía de Minamata, tendo como consequência a morte de mais de mil pessoas, principalmente aquelas que residiam próximo à baía (VASSALO et al., 1996; ALEXANDRE, 2006). Neste ocorrido, foi diagnosticado o primeiro caso de lesão do sistema nervoso central causado por mercúrio, além de enfermidades neurológicas congênitas, denominadas “doença de Minamata” ou “mal de Minamata”.



**Figura 3:** Baía de Minamata atualmente (SHIMBUN, 2006), e Rio Doce contaminado com metais pesados (BRAGA, 2015) (esquerda e direita, respectivamente).

No Brasil, podemos citar, de acordo com Passos e Mergler (2008), que especialmente na região amazônica, a intoxicação por mercúrio iniciou-se por intermédio da utilização de métodos primitivos e perigosos na atividade descontrolada de mineração e extração de ouro. Esse tipo de atividade culminou com o lançamento de mercúrio no meio ambiente, aumentando o nível desse metal nas águas e nos solos. Sabe-se que aproximadamente mais de 650 mil pessoas estão ou já estiveram envolvidas nos processos de garimpo na Amazônia, resultado uma descarga anual de aproximadamente 90 a 120 toneladas de mercúrio lançados no ecossistema local (NRIAGU et al., 1992).

Entretanto, considerando a população geral, a exposição ao mercúrio se dá por três principais fontes: consumo de peixes contaminados, uso e manipulação de amálgamas dentários e timerosal presente em vacinas (CLARKSON, 2007; VASSALLO et al., 2011).

Com relação ao consumo de alimentos (principalmente peixes e frutos do mar), como já comentado, o mercúrio pode-se bioacumular e sofrer biomagnificação nos organismos vivos. A bioacumulação do mercúrio é facilitada por sua lipossolubilidade que torna mais fácil o transporte através das membranas celulares, e por sua capacidade de reagir e se ligar a componentes intracelulares (WHO, 1996; UNEP, 2002). A biomagnificação nada mais é que o acúmulo de mercúrio por níveis tróficos sucessivos. Os processos de bioacumulação e biomagnificação tornam o mercúrio um importante fator de risco à saúde humana (WHO, 1990; OLIVERO et al., 1997; BOENING, 2000). Como o ser humano encontra-se no topo da cadeia alimentar, tem sido consenso que uma das principais formas de exposição humana ao mercúrio é através do consumo de peixes contaminados com metilmercúrio (MAGOS et al., 2006; McKELVEY et al., 2007).

Ademais, embora em menor proporção, existe também a contaminação por intermédio de restauração dentária com amálgama de mercúrio. Profissionais de odontologia, seus auxiliares e pacientes que usam amálgama de mercúrio para restaurar obturações dentárias estão frequentemente expostos ao vapor de mercúrio que é inalado e posteriormente absorvido (CLARKSON et al., 1997). Finalmente, outra forma de exposição humana ao mercúrio descrita para a população em geral ocorre por intermédio do timerosal que é utilizado como conservante de vacinas devido a sua ação bactericida proveniente do etilmercúrio (VASSALLO et al., 2011).

### **1.3.2 Mecanismos de transporte e toxicidade**

Devido a uma característica lipossolúvel, o mercúrio é altamente difusível pelas membranas celulares, barreira hematoencefálica e placentária, indo de encontro aos órgãos-alvo. Quando presente na corrente sanguínea, este elemento sofre rápida oxidação nas hemácias e nos tecidos por intermédio das enzimas catalase e peroxidase, transformando-se em íons mercurioso ( $\text{Hg}^{1+}$ ) e mercúrico

( $\text{Hg}^{2+}$ ) o que reduz um pouco sua absorção através das membranas (ASANO et al., 2000; CLARKSON et al., 2007). Os íons de mercúrio inorgânico têm baixa lipofilicidade e conseqüentemente, pouca capacidade de ultrapassar as membranas celulares (CLARKSON et al., 2007). Porém, os íons de mercúrio inorgânico oxidado têm grande afinidade ao grupamento tiol ( $-\text{SH}$ ) das diversas enzimas celulares e dessa maneira pode interferir na atividade enzimática, levando a disfunção e lesão celular/tecidual, interrupção do metabolismo e morte celular (ASANO et al., 2000; GILMAN et al., 2007). Além disso, podem ser ligados a outras biomoléculas sem ação enzimática, mas que contenham grupamentos tiol, tais como glutatona, cisteína, homocisteína, N-acetilcisteína ou albumina, e até mesmo ao selênio (BRIDGES et al., 2017).

O mercúrio orgânico (principalmente metilmercúrio) quando ingerido é quase que completamente absorvido e transportado pela corrente sanguínea (WHO, 1990). É através dela, que em poucos dias se notam concentrações tóxicas no sistema nervoso central devido sua fácil transposição através da barreira hematoencefálica (NORDBERG, 2014). Após ser absorvido, o mercúrio é distribuído primeiramente para o sistema nervoso central e rins (BRODKIN et al., 2007). O metilmercúrio entra na célula em grande parte pela formação de um complexo com os aminoácidos L-cisteína e homocisteína, sendo eliminado junto com o antioxidante glutatona (BALLATORI et al., 1985). Uma vez dentro da célula, os conjugados de mercúrio podem levar a alterações na metilação e reparo do DNA, inflamação, lesão mitocondrial e estresse oxidativo (BRIDGES et al., 2017).

Em relação aos possíveis mecanismos de toxicidade do mercúrio podemos citar além da inativação de enzimas, também sua ação sobre proteínas estruturais e processos de transporte através da membrana celular (STOHS et al., 1995).

O mercúrio é capaz de reduzir os níveis enzimáticos das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutatona, glutatona redutase e glutatona peroxidase, proporcionando uma menor proteção celular em relação ao estresse oxidativo (RIBAROV et al., 1981; BENOVO et al., 1990). Além disso, ele é capaz de induzir a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e mudanças no metabolismo do grupo heme (ZALUPS et al., 1994; MAHBOOB et al., 2001; ROSALES et al., 2005; VIRTANEN et al., 2007; CUNHA, 2008).

Também induz a despolarização da membrana interna mitocondrial, tendo como consequência o aumento na formação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (CUNHA, 2008). Estes acontecimentos estão ligados à redução de glutathione mediada pelo íon  $\text{Hg}^{+2}$  e com a oxidação da NADPH, o que leva a uma condição de estresse oxidativo caracterizado pelo aumento da sensibilidade da membrana mitocondrial à peroxidação lipídica (LUND et al., 1991, 1993).

#### 1.4 EFEITOS TÓXICOS DO MERCÚRIO SOBRE SISTEMAS ORGÂNICOS

Todas as formas de mercúrio são tóxicas e o seu efeito tóxico está relacionado ao tempo de exposição, a via de exposição e a forma físico-química do metal (ZALUPS, 2000). A maioria das informações encontradas na literatura sobre o mercúrio está relacionada aos efeitos tóxicos sobre os sistemas nervoso central, renal e cardiovascular, no entanto o mercúrio também exerce efeito sobre os sistemas imunológico, respiratório, hepático e reprodutor (PEÇANHA, 2009). A fim de melhor compreender os aspectos relacionados ao nosso estudo, cabe destaque aos seus efeitos sobre o sistema renal e cardiovascular.

##### 1.4.1 Efeitos tóxicos sobre o sistema renal

Devido ao seu grande fluxo sanguíneo (25% do débito cardíaco) e intensa atividade enzimática na execução de suas funções, e por desempenhar importante papel na excreção de xenobióticos e substâncias tóxicas, o rim é o órgão-alvo preferencial da maioria destas substâncias (PASSOW et al., 1961; ZALUPS, 1993; VAN VLEET et al., 2003).

Tanto as formas orgânicas quanto inorgânicas de mercúrio se acumulam imediatamente no tecido renal consequente à entrada no organismo. Assim, ainda que o rim seja o principal local de acumulação e toxicidade de formas inorgânicas de mercúrio, a exposição ao mercúrio orgânico também pode causar prejuízos graves. (FISHBEIN, 1971; HONG et al., 2012; EKAWANTI et al., 2015). Ao longo do néfron, o túbulo proximal é o principal local de captação e acumulação de espécies mercuriais (ZALUPS, 2000).

O mercúrio inorgânico acumula-se rapidamente no tecido renal, com até 50% de uma dose não tóxica dentro de poucas horas após a exposição (ZALUPS, 1993). A maioria dos íons mercúrico se acumulam nas células epiteliais do túbulo proximal embora alguns poucos efeitos possam ser notados pelo acúmulo nos demais segmentos tubulares (ZALUPS, 2000). Os íons mercúrico parecem ser transportados no túbulo renal através de mecanismos de transporte presentes nas membranas luminal e basolateral, ou seja, a partir do ultrafiltrado e do fluxo através dos capilares peritubulares (ZALUPS et al., 1995b; ZALUPS et al., 1997). Estudos em túbulos perfundidos isolados é descrito a participação predominante de transportadores de aminoácidos (principalmente, transportador de cisteína) na absorção luminal de conjugados de mercúrio com grupo tiol em cisteínas (Cys-Hg-Cys) tanto por co-transporte com sódio, quanto por transportadores independentes de sódio (CANNON et al., 2000, 2001), e transportadores aniônicos orgânicos (OAT 1 e 3) na absorção basolateral (KOJIMA et al., 2002; MOTOHASHI et al., 2002). Além disso, evidências indicam que 40-60% do íon mercúrico que se acumula no túbulo proximal parece ser via membrana basolateral a partir do sangue e, conseqüentemente interstício do córtex renal (ZALUPS et al., 1995a, 1995b, 1997, 1998).

A nefrotoxicidade do mercúrio se manifesta principalmente por falência renal aguda em seres humanos e animais experimentais, caracterizada por necrose tubular, principalmente dos túbulos proximais (CLARKSON, 1997; ZALLUPS, 2000) sendo as lesões renais dose-dependentes (HOUSER et al, 1992; BOHETS et al., 1995; BURTON et al., 1995). Estudos demonstram que a exposição crônica ao mercúrio elementar ( $Hg^0$ ) em humanos provoca glomerulonefrite, disfunção tubular e síndrome nefrótica (BECKER et al., 1962; TUBBS et al., 1982; BERNARD et al., 1989; KOBAL et al., 2000). Em relação aos impactos clínicos, em 2007, Hodgson et al., observaram que existe uma relação positiva entre a exposição a ambientes com mercúrio e o maior risco de morte por doença renal. Enquanto a exposição a baixas doses de mercúrio pode resultar em pequenas mudanças da função renal que são, eventualmente, compensadas, a exposição a doses mais altas provoca maior dano a função renal frequentemente levando à insuficiência renal, podendo levar à morte (ZALUPS et al., 1994; REMUZZI et al., 1998; HODGSON et al., 2007). O aumento da excreção de proteínas e o aumento da atividade de algumas enzimas na urina

podem ser indicativos de tubulopatia na disfunção renal em indivíduos expostos ao mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) (BARREGARD et al., 1988; KOBAL et al., 2000).

Historicamente os diuréticos mercuriais foram utilizados devido a sua capacidade de interferir – reduzir – na atividade de enzimas à proteínas transportadoras ao longo dos túbulos renais e assim aumentar a excreção de solutos e água. Entretanto, estudos clínicos relataram evidências de lesão renal após exposição aguda e crônica a várias espécies de mercúrio, sendo a forma mais grave induzida após a exposição aos íons mercúricos ( $\text{Hg}^{2+}$ ) (POLLACK et al. 2015; HA et al. 2016;). Vários autores indicam que essa doença renal afeta inicialmente o túbulo proximal, sugerindo que esta seção do néfron é a parte mais sensível aos efeitos tóxicos do mercúrio (ZALUPS et al., 1987, 2000, 2014; BRIDGES et al. 2013). Já a exposição a doses moderadas ou altas (4 mg/kg) de  $\text{HgCl}_2$  resulta em necrose celular não só nos túbulos proximais, mas também na alça de Henle e nos segmentos distais do néfron (McDOWELL et al. 1976; ZALME et al. 1976; ZALUPS et al., 2014). Nessas condições, a lesão tem início rápido, sendo detectado edema mitocondrial e núcleos picnóticos em apenas 3h (RODIN et al., 1962; GRITZKA et al., 1968), até evoluir com ruptura da membrana plasmática, perda de vilosidades e complexos juncionais no epitélio tubular entre 12 e 24h após exposição ao  $\text{HgCl}_2$  (RODIN et al., 1962; GRITZKA et al., 1968; McDOWELL et al., 1976; ZALME et al., 1976). Embora a maior parte das informações da literatura reforçam a precoce susceptibilidade tubular a exposição ao mercúrio, existem alguns estudos que indicam também alterações no fluxo plasmático renal e filtração glomerular já após 1h de intoxicação aguda com  $\text{HgCl}_2$  (5 mg/kg) em ratos (GIRARDI et al., 1989; GIRARDI et al., 1991, 1995).

#### **1.4.2 Efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular**

É bem conhecido que indivíduos expostos ao mercúrio apresentam um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares (HUSSAIN et al., 1997; SU et al., 1979; SALONEN et al., 1995). No ano de 1975, Wojciechowski et al. foram uns dos primeiros a associarem exposição ao mercúrio a alterações cardiovasculares, vindo a mostrar que animais evoluíam com bradicardia, trombose em artérias de pequeno e médio calibre, necrose nos músculos papilares e no endotélio perivalvular, além de

apresentar proliferação endotelial, processo inflamatório e fibrose na aorta ascendente após inalar vapor de mercúrio. Estudos na década de 90 observaram que corações de ratos expostos de forma aguda a altas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  (0,5, 1, 2 e 10  $\mu\text{M}$ ) apresentavam arritmias, alteração na condução atrioventricular, redução da pressão sistólica e do desenvolvimento de força (MASSARONI et al., 1992; VASSALLO et al., 1999). Além disso, quando eram expostos a altas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  apresentavam aumento da pressão de perfusão coronariana, sugerindo aumento da resistência vascular (da CUNHA et al., 2000). Além disso, também foi observado que a exposição aguda a altas doses de  $\text{HgCl}_2$  promovia vasoconstrição no leito vascular caudal de ratos (da CUNHA et al., 2000), reforçando seus efeitos sobre o controle do tônus vascular.

De fato, já nos anos de 1987 e 1992 Wakita e Carmignani et al., respectivamente, haviam observado que a exposição crônica ao mercúrio aumentava a resistência vascular, podendo provocar hipertensão arterial. Por outro lado, em 1999 Rossoni et al., observaram que a exposição aguda a altas doses (10  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{HgCl}_2$  promovia aumento da resistência vascular pulmonar e redução da pressão arterial de ratos.

Os mecanismos pelos quais o mercúrio exerce efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular está intimamente relacionado ao aumento do estresse oxidativo. Foi observado que a exposição ao mercúrio aumenta a produção de radicais livres em modelos animais (JANSSON et al., 1993; MAGOS, 1997; CLARKSON, 1997) e isto pode ocorrer devido à participação do mercúrio na reação de Fenton por promover a formação de radicais livres (VALKO et al., 2006) e a redução da atividade de enzimas antioxidantes. A redução da atividade de enzimas antioxidantes aumenta a ocorrência de peroxidação lipídica e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GANTHER, 1980; MAGOS et al., 2006; VALKO et al., 2006; VIRTANEN et al., 2006).

Nesse sentido, o endotélio vascular parece ser o principal alvo desse desequilíbrio redox promovido pelo mercúrio (WIGGERS et al., 2008; PEÇANHA et al., 2010; GIUBERTI, 2010). Dentre essas alterações, exercem papel importante o aumento de radicais livres e produção local de angiotensina II (VASSALLO et al., 2011). De fato, a disfunção endotelial é um fator crucial presente na fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares tais como a hipertensão, aterosclerose, infarto



agudo do miocárdio e doença arterial coronariana (SALONEN et al., 2000; HOUSTON et al., 2007; VASSALLO et al., 2011). Atualmente, a literatura indica que a exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , agudamente ou cronicamente, e mesmo em baixas concentrações, causa disfunção endotelial, secundária ao aumento de estresse oxidativo, do sistema renina-angiotensina local e de prostanóides vasoconstritores (da CUNHA et al., 2000; WIGGERS et al., 2008; PEÇANHA et al., 2010; FURIERI et al., 2011,; VASSALLO et al., 2011), prejudicando assim o controle do tônus vascular.

## 1.5 CONTROLE DO TÔNUS VASCULAR

O controle do fluxo sanguíneo através da regulação do tônus do músculo liso vascular (MLV) se dá por ação do sistema nervoso e por hormônios circulantes, mas também localmente por mecanismos intrínsecos, autócrinos e parácrinos, destacando-se o endotélio vascular.

### 1.5.1 Papel do endotélio vascular

O endotélio vascular é uma camada de células finas que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Sabe-se que sua função não é de simples barreira passiva entre os elementos do sangue circulante e o interstício. O endotélio intacto pode ser considerado um órgão endócrino, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando localmente compostos metabolicamente ativos, que atuam nas células vizinhas, tendo a capacidade de modular a motricidade vascular, a coagulação sanguínea, a inflamação, o crescimento e a proliferação vascular (FURCHGOTT et al., 1980, 1984, 1989; CARDOSO et al., 1994; AIRES et al., 2008).

O endotélio controla o tônus da musculatura lisa vascular basicamente por mediar vasodilatação ou vasoconstrição. É capaz de produzir tanto substâncias vasodilatadoras [óxido nítrico (NO), prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)] (MONCADA et al., 1977; FURCHGOTT et al., 1980, 1989; VANHOUTTE et al., 1999), como também substâncias vasoconstritoras [endotelina-1, angiotensina II (angio II), prostanóides derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas  $\text{H}_2$ ,  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGH}_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) e tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), além de espécies reativas do oxigênio como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )]

(FURCHGOTT, 1984; YANAGISAWA et al., 1988; FURCHGOTT et al., 1989a, 1989b; VANHOUTTE et al., 1999).

Assim, na alteração de sua função endotelial, denominada disfunção endotelial, podem ocorrer inúmeros eventos incluindo a redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio devido à diminuição da produção e/ou biodisponibilidade dos seus fatores (MATURANA et al., 2007).

### **1.5.2 Espécies reativas do oxigênio e função vascular**

As células vasculares podem produzir espécies reativas do oxigênio (EROs) que são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, altamente reativas e que participam da ativação e inativação de muitas vias de sinalização. Em condições normais são encontradas em baixos níveis no interior celular e são geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário porque elas modulam a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo, ou por ativar vias de sinalização intracelular que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (SZASZ, 2007). Casos clínicos onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associados ao desenvolvimento de doenças como câncer, artrites, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (GRIENDLING et al., 2003; VALKO et al., 2006).

O nosso organismo utiliza o  $O_2$  e reações de oxidação para o fornecimento de energia e para a defesa contra invasores. A maioria do  $O_2$  utilizado no metabolismo aeróbico é reduzido diretamente a  $H_2O$  pelo complexo citocromo oxidase, que evita a formação de produtos intermediários. No entanto, uma série de intermediários oxigenados reativos é formado através de uma outra via que envolve a produção do radical livre  $O_2^{\bullet -}$  (ânion superóxido) pela redução de um elétron do oxigênio molecular. O  $O_2^{\bullet -}$  pode agir como um agente oxidante, sendo reduzido a  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio), ou como agente redutor, doando o seu elétron extra ao óxido nítrico (NO) para formar  $ONOO^-$  (peroxinitrito) (CARDOSO et al., 1994).

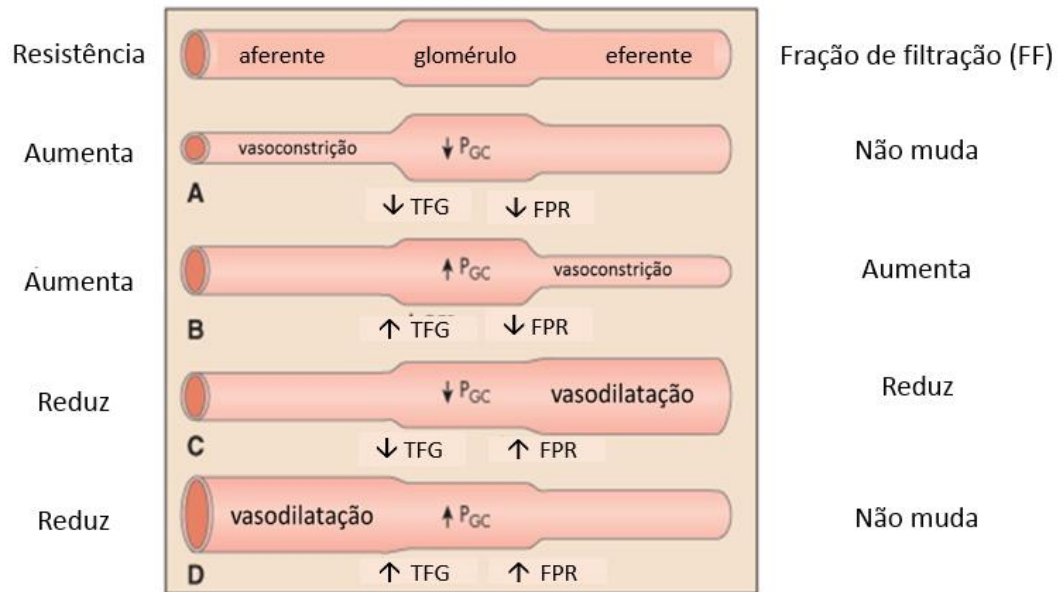
Em condições fisiológicas, a quantidade de enzima superóxido dismutase (SOD) assegura que a primeira reação ocorra preferencialmente. Contudo, em condições de estresse oxidativo, quando as células são expostas a níveis excessivos de espécies oxigenadas reativas, quantidades significativas de  $O_2^{\cdot-}$  reagem com o NO para formar  $ONOO^-$ . Nesse caso, haverá uma diminuição da biodisponibilidade de NO endotelial, diminuindo o seu efeito vasorrelaxante, somado ao próprio efeito vasoconstritor do  $O_2^{\cdot-}$ , além das consequências deletérias do  $ONOO^-$  (CARDOSO et al., 1994). De fato, em estudos utilizando modelos crônicos de exposição ao mercúrio, tem sido demonstrado que a disfunção endotelial presente está fortemente associada a menor biodisponibilidade de NO e aumento da geração de  $O_2^{\cdot-}$  em diferentes tipos de vasos (WIGGERS, et al., 2008; FURIERI et al., 2011; AZEVEDO et al., 2016).

## 1.6 CIRCULAÇÃO RENAL

Os rins são órgãos altamente vascularizados, e mesmo correspondendo a menos de 0,5% do peso corporal, recebem um fluxo sanguíneo próximo de 25% do débito cardíaco. Quando avaliados pelo peso do tecido, o fluxo sanguíneo renal é quatro vezes maior que o do fígado e oito vezes maior que o coronariano. O fluxo sanguíneo renal se divide em cortical, mais rápido e correspondente a 90% do fluxo renal total; e medular, que se distribui pela medula renal e é mais lento, correspondendo a 10% do fluxo total. A circulação renal inicia-se pela artéria renal que tem origem na aorta abdominal superior, e se divide em ramos dorsal e ventral, que por sua vez dão origem às artérias interlobares. Estas, se dirigem da medula ao córtex e, ao atingir o limite entre essas zonas, se dispõem em ramos num sentido transversal, formando as artérias arqueadas. Partindo destas em direção ao córtex renal, distribuem-se as artérias interlobulares, as quais são a origem das arteríolas aferentes dos glomérulos que vão originar os capilares glomerulares, formando posteriormente as arteríolas eferentes, que vão se dividir nos capilares peritubulares e dar início a circulação venosa, que acompanha a circulação arterial, por ordem inversa e sem ter correspondência com as arteríolas aferentes. Esta, inicia-se pelas veias interlobulares, prosseguindo para as veias arqueadas, depois para as veias interlobares e termina na veia renal (AIRES et al., 2008). Cabe ressaltar que dentre

todos os vasos citados, os mais importantes e responsáveis pela resistência vascular renal são as artérias arqueadas, interlobulares e as arteríolas aferente e eferente.

Em relação aos fatores que modulam a vasomotricidade renal podemos citar a regulação local (fatores intrínsecos) e distal (fatores extrínsecos). Dando ênfase à regulação local, o fluxo sanguíneo é influenciado por alguns fatores locais, como, por exemplo, pressão de perfusão, tensão de cisalhamento e endotélio vascular (síntese de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras) (AIRES et al., 2008). O endotélio desempenha importante papel na síntese de óxido nítrico, que por sua vez tem a finalidade de diminuir a resistência vascular renal. Existe um nível basal de liberação de óxido nítrico que atua evitando a vasoconstrição excessiva no rim. A utilização, por exemplo, de fármacos que inibem a formação do óxido nítrico, gera um aumento da resistência vascular renal, diminuindo, conseqüentemente, a taxa de filtração glomerular e a excreção urinária de sódio, aumentando a pressão arterial. A modulação diferencial do tônus vascular nas arteríolas aferente e eferente levam a mudanças paralelas ou dissociadas do fluxo sanguíneo renal, resistência vascular renal e filtração glomerular. Sendo assim, eventos fisiológicos, patológicos ou toxicológicos podem diferencialmente modificar a função renal por meio de modificações na hemodinâmica renal. A figura 4 representa bem os efeitos das alterações no tônus das arteríolas aferentes e eferentes (vasoconstrição e vasodilatação), bem como as modificações (aumento ou redução) na taxa de filtração glomerular (TFG), no fluxo plasmático renal (FPR), na pressão hidrostática no capilar glomerular ( $P_{GC}$ ), na fração de filtração (FF) e na resistência (BERN et al., 2009).



**Figura 4:** Efeitos das alterações no tônus das arteríolas aferentes e eferentes na TFG, FPR,  $P_{GC}$ , FF e resistência. A constrição isolada da arteríola aferente reduz a  $P_{GC}$  e consequentemente reduz a TFG e o FPR proporcionalmente, aumentando a resistência e não modificando a FF (A). A constrição isolada da arteríola eferente aumenta a  $P_{GC}$  e consequentemente aumenta a TFG e reduz o FPR, aumentando a resistência e a FF (B). A vasodilatação somente da arteríola eferente reduz a  $P_{GC}$  e consequentemente reduz a TFG e aumenta o FPR, reduzindo a resistência e a FF (C). A vasodilatação da arteríola aferente aumenta a  $P_{GC}$  e consequentemente aumenta a TFG e o FPR proporcionalmente, reduzindo a resistência e não modificando a FF (D). TFG: taxa de filtração glomerular; FPR: fluxo plasmático renal;  $P_{GC}$ : pressão hidrostática no capilar glomerular; FF: fração de filtração. Modificada de Berne et al., 2009.

### 1.7. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

Sabendo que o mercúrio é tóxico tanto para o sistema renal quanto para o cardiovascular e que, mesmo em doses baixas e de forma aguda, causa alterações na reatividade de vasos sistêmicos (aorta, artéria mesentérica, cerebral e coronária), e que a manutenção da hemodinâmica renal é imprescindível não só para depuração do plasma como também para homeostase do sistema cardiovascular, nosso estudo pretendeu investigar as possíveis alterações no leito vascular renal de ratos causadas pela infusão aguda de  $HgCl_2$  em concentrações e tempos diferentes, avaliando se as alterações de função renal poderiam ser associadas a alterações na função da vasculatura renal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos agudos do  $\text{HgCl}_2$  sobre a vasculatura renal de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da infusão aguda de  $\text{HgCl}_2$  em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações sobre a reatividade do leito vascular renal isolado.

Determinar o teor de mercúrio acumulado no rim isolado e perfundido agudamente com  $\text{HgCl}_2$ .

Avaliar os efeitos da injeção de  $\text{HgCl}_2$  sobre a hemodinâmica renal e função renal de ratos anestesiados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 80 (setenta) ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (58 para experimentos *in vitro*, 12 para *in vivo*, 10 não aproveitados), com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 200 e 250 g, disponibilizados pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS – UFES). Tais animais foram mantidos em gaiolas coletivas, sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 h, tendo livre acesso a água tratada e ração especial para roedores. Todos os procedimentos experimentais e o uso e cuidado com esses animais foram realizados de acordo com as normas para pesquisa biomédica que determinam os cuidados para o uso do animal de laboratório em ensaios experimentais, de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Todos os protocolos foram analisados e aprovados pela CEUA-UFES com projeto sob nº 051/2011.

#### 3.2 EFEITOS AGUDOS DO HgCl<sub>2</sub> NO RIM ISOLADO E PERFUNDIDO

##### 3.2.1 Procedimentos cirúrgicos para retirada do rim

No presente estudo os ratos tiveram seus rins esquerdos isolados e perfundidos, numa cuba para órgãos isolados, para análise da reatividade vascular renal. Utilizamos a técnica de perfusão de leitos vasculares descrita por França et al. (1997) e modificada por dos Santos et al. (2006). Para tanto, com o animal anestesiado com xilazina 2% (10 mg/kg) e quetamina 10% (90 mg/kg) e heparinizado (500 UI) por via intraperitoneal, foi realizada laparotomia mediana por meio de uma incisão xifo-púbica para adequada visualização e isolamento da aorta e órgãos retroperitoneais esquerdos. Após oclusão da aorta proximal e distal a origem da artéria renal para cessar o sangramento e auxiliar na inserção de uma cânula, uma cânula PE50 preenchida com solução nutritiva foi colocada dentro da artéria

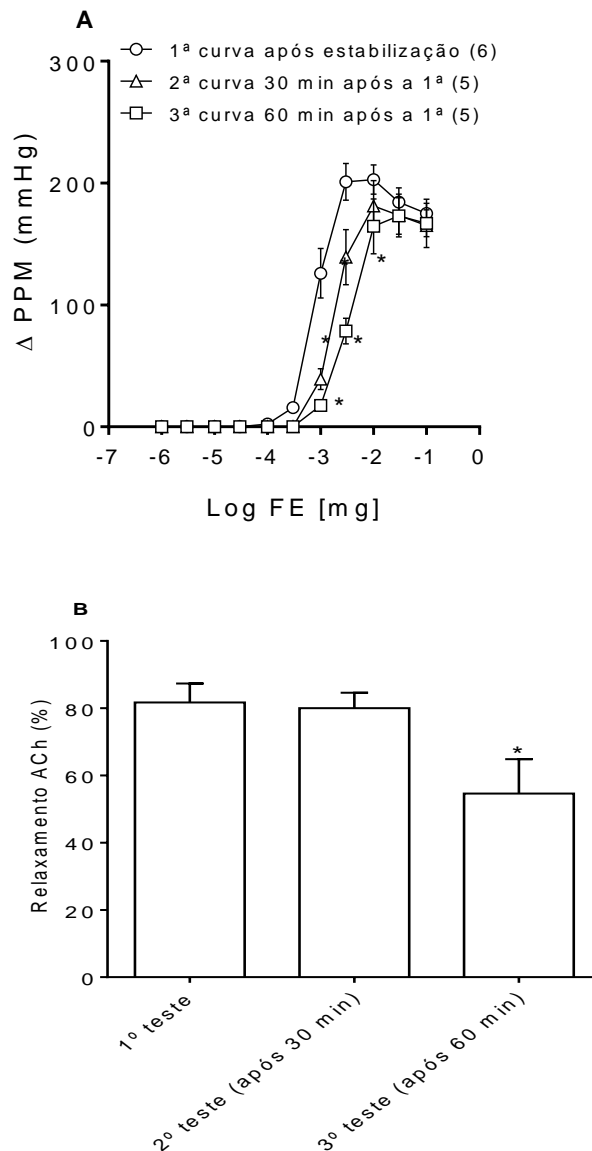
renal esquerda e fixada. Prontamente, o rim foi cuidadosamente separado, retirado e colocado em banho com temperatura controlada, onde era perfundido via cânula com solução nutritora de Krebs-Henseleit (KH), cuja composição em mM (milimolar) é  $\text{NaHCO}_3$  27;  $\text{NaCl}$  119;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{KCl}$  5;  $\text{CaCl}_2$  1,25; Glicose 11; EDTA 0,03. Esta solução era mantida à temperatura constante de  $36 \pm 0,5$  °C, mantendo o pH estável em 7,4 pelo borbulhamento constante de mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ). O fluxo foi mantido constante em 5,5 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (Milan, Colombo, Paraná, Brasil). A pressão de perfusão do leito renal era instantaneamente captada por um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA, USA), que ficava situado entre a bomba peristáltica e a cânula. Considerando a relação  $P = F \times R$  (P: pressão, F: fluxo e R: resistência), e sendo o fluxo constante, as variações de pressão de perfusão indicam variações paralelas da resistência vascular. Para efeito de coleta e análise dos dados, em cada preparação do leito renal isolado era adquirida a pressão de perfusão média (PPM) ao longo das diferentes condições experimentais testadas.

### 3.2.2 Protocolos experimentais *in vitro*

Devido à inexistência de estudos prévios que realizassem análises funcionais seriadas no leito vascular renal isolado e perfundido, o que demandaria longo período de experimento, realizamos um estudo preliminar com rins isolados e perfundidos repetindo-se protocolos seguidos após 30 e 60 minutos de perfusão com solução nutriente KH. De acordo com esse estudo, chegamos à conclusão de que não seria possível fazer os protocolos propostos no mesmo rim de maneira seriada (antes e após a exposição ao mercúrio), visto que o tempo de experimento poderia influenciar o resultado. Por exemplo, como podemos observar na figura 5 A, a resposta vasoconstritora à fenilefrina (FE) reduz de maneira significativa após 30 minutos da primeira curva dose-resposta, e o mesmo acontece após 30 minutos da segunda curva dose-resposta. Desta forma, a melhor alternativa foi fazer os diferentes grupos experimentais (tempos de exposição e concentração do  $\text{HgCl}_2$ ) em séries separadas de amostras. Cabe mencionar que antes de iniciarmos os protocolos experimentais no leito renal isolado, após a devida estabilização da



preparação (aproximadamente 30 a 45 minutos), era feito um teste de relaxamento à acetilcolina (ACh) para que pudéssemos confirmar a integridade endotelial do órgão perfundido pós-cirurgia, e assim avaliar os efeitos da perfusão com  $\text{HgCl}_2$  sobre o leito vascular renal funcionalmente íntegro. Ademais, vale também mencionar que a análise do efeito da perfusão com  $\text{HgCl}_2$  sobre a vasodilatação endotélio-dependente teve que ser comparada com o seu devido grupo controle (perfusão com solução KH somente) pareados pelo tempo de experimento, visto que nesses protocolos de padronização evidenciamos certa influência do tempo de experimento também sobre a vasodilatação (Figura 5 B).



**Figura 5:** Efeito do tempo de experimento sobre (A) curva dose-resposta à fenilefrina (FE) e (B) resposta dilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (ACh). O número de animais usados está indicado entre parênteses. Em A,  $\Delta \text{PPM}$ : variação da pressão de perfusão média. Log

FE: logaritmo da dose de fenilefrina (em mg). ANOVA duas vias seguida de teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. 1ª curva. Em B, os resultados estão expressos como porcentagem de relaxamento à ACh em relação à pré-contracção com FE. ANOVA uma via seguida de post-hoc de Bonferroni \* $P < 0,05$  vs. 1º teste.

### 3.2.3 Parâmetros de reatividade vascular analisados

Após montagem do rim na preparação, o mesmo era aleatoriamente alocado para o grupo controle (Ct) ou mercúrio (Hg). Para análise do tempo de exposição, foram realizados 30 ou 90 minutos de perfusão com solução KH adicionada ou não de  $\text{HgCl}_2$ . Para análise da concentração de  $\text{HgCl}_2$ , foram utilizadas solução KH adicionadas de  $\text{HgCl}_2$  a 3, 30 ou 300 nmol/L. Essas concentrações (3, 30 e 300 nM) são encontradas em indivíduos não intoxicados, indivíduos expostos ocupacionalmente e indivíduos gravemente intoxicados, respectivamente (WIGGERS et al., 2008; AZEVEDO, 2016).

Resumidamente, os protocolos experimentais seguiram a seguinte ordem:

#### 1) Etapa de estabilização e análise de viabilidade:

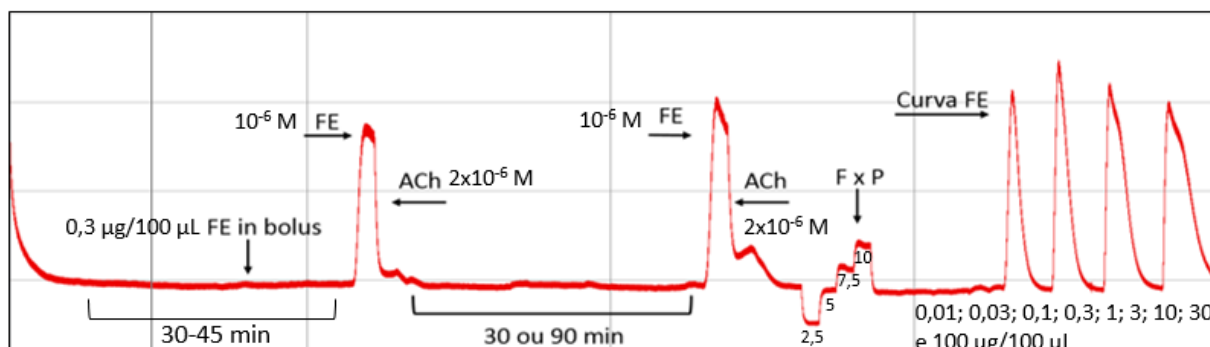
- Estabilização por 30-45 minutos com infusão de solução de KH;
- Injeção *in bolus* de FE 0,3  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ , para sensibilizar a preparação e avaliar a viabilidade da constrição (até o retorno da PPM à basal);
- Pré-contracção pela perfusão de KH contendo FE ( $10^{-6}$  M) seguida de relaxamento pela adição de ACh ( $2 \times 10^{-6}$  M) na solução de perfusão para analisar a vasodilatação endotélio-dependente e testar a viabilidade do endotélio (só foram incluídos os que obtiveram relaxamento maior que 70%) (até o máximo de relaxamento obtido);

#### 2) Protocolos experimentais de reatividade vascular:

- Perfusão com KH normal ou adicionada de  $\text{HgCl}_2$  (3, 30 ou 300 nM) por 30 ou 90 minutos;
- Nova pré-contracção pela perfusão de KH contendo FE seguida da adição de ACh para analisar o efeito do  $\text{HgCl}_2$  sobre a vasodilatação endotélio-dependente;
- Construção de curva Fluxo vs. Pressão por meio de mudanças no fluxo promovido pela bomba peristáltica para 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mL/min, com duração

de 2 minutos para cada fluxo;

- Construção de curva de vasoconstricção à FE dose-resposta (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100  $\mu\text{g}$ , por injeções *in bolus* de 100  $\mu\text{L}$ ), aguardando o devido retorno à situação basal após cada dose.



**Figura 6:** Registro da pressão de perfusão renal com indicação dos protocolos experimentais realizados. Da esquerda para a direita: injeção *in bolus* de fenilefrina (FE) para sensibilizar a preparação, pré-contracção com FE seguida de relaxamento com acetilcolina (ACh), intervalo de perfusão (30 ou 90 minutos) com Krebs-Henseleit (KH) somente ou contendo cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), pré-contracção com FE seguida de relaxamento com ACh, curva fluxo x pressão (FxP), e curva dose-resposta à FE.

### 3.2.4 Teor de mercúrio depositado no rim isolado e perfundido

Analizamos o teor de mercúrio depositado em córtex e medula isolados de rins perfundidos nos protocolos acima descritos, utilizando a técnica de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Logo após cada procedimento de perfusão renal, os rins eram colocados em placas de Petri e manipulados com cuidadosamente, com material exclusivo para este fim e devidamente limpos para evitar contaminação das amostras por qualquer outro material que contivesse mercúrio. O rim era dividido em córtex e medula, que eram congelados a  $-20^\circ\text{C}$ . Para este protocolo, utilizamos somente as amostras submetidas ao maior tempo de perfusão (90 minutos) com  $\text{HgCl}_2$  nas três concentrações utilizadas (3, 30 e 300 nM). A ICP-MS é um tipo de espectrometria de massa capaz de detectar metais e diversos não metais em concentrações baixíssimas (GINÉ et al., 1998).

As amostras de rins foram secas em estufa analógica de esterilização e

secagem durante aproximadamente 72 h a cerca de 60°C e depois foram maceradas. Uma decomposição ácida assistida por micro-ondas (GO Multiwave Anton-Paar, Áustria) foi realizada com as amostras utilizando 0,1 g de amostra, 1 mL de HNO<sub>3</sub> 65% w/w PA (Merck Millipore, EUA), 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v PA (Proquímios, Rio de Janeiro, BRA) e 6 mL de água ultrapura (resistividade <18,2 MΩ, PURELAB Ultra, ELGA, UK). Após o arrefecimento, a solução foi diluída para 15 mL. Antes da análise, a solução ficou ainda mais diluída (5:10). Irídio (5 µg/L) e ouro (1 mg/L) foram utilizados como padrão interno e para evitar efeito memória, respectivamente. A amostra em branco foi preparada nas mesmas condições que as amostras experimentais.

As análises foram realizadas com um espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Nexlon 300-D, Perkin Elmer, Alemanha). O sistema de introdução de amostras foi composto por câmara de nebulização ciclônica e um nebulizador Meinhard®. A relação massa/carga (m/z) monitorada foi de Hg<sup>202</sup>.

### 3.3 EFEITOS AGUDOS DA INJEÇÃO DE HgCl<sub>2</sub> NA HEMODINÂMICA E FUNÇÃO RENAL DE RATOS ANESTESIADOS

#### 3.3.1 Procedimentos cirúrgicos

Todos os experimentos relativos aos protocolos *in vivo* foram feitos no laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais - USP. Para análise *in vivo* dos parâmetros de função renal, primeiramente os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Cristália, São Paulo, Brasil). Posteriormente, a traqueia foi canulada com cateter PE-240 sendo mantida ventilação espontânea; a veia jugular foi canulada com cateter PE-50 para a infusão de inulina, solução salina (NaCl 0,9%) pura ou contendo HgCl<sub>2</sub> na concentração de 0,3 mM (desta solução, foi injetado 250 µL no animal com 300 g), próximo de 0,0656 mg/kg (Sigma); a artéria carótida foi canulada com cateter PE-50 para análise da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) (Biopack System Inc., Santa Bárbara – CA), e para a coleta de amostras de sangue; e a bexiga foi canulada com cateter PE-240,

após uma incisão abdominal, para a coleta de amostras de urina. Por último, foi feita uma incisão mediana abdominal, o pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada, assim, cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico foi acoplada na artéria renal.

### 3.3.2 Protocolos experimentais

Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/kg diluída em 1 mL de solução salina a 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/kg em solução salina a 0,9%) a 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Após 30 minutos de espera, foi injetado via veia jugular 250 µL de solução salina ou HgCl<sub>2</sub> a 0,3 mM, e os animais ficaram em observação por mais 90 minutos. Nesse período, em intervalos de 30 minutos, foi aferida a PAM e a FC, bem como a coleta de amostras de urina. Foram coletadas três amostras de urina a cada 30 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento. Por último, para avaliar o fluxo sanguíneo renal (FSR) foi acoplada a sonda de fluxo ultrassônico na artéria renal para mensuração do fluxo sanguíneo renal em mL/min (T110; Transonic Systems, Bethesda, MD, EUA).

Após a finalização dos experimentos, os animais foram sacrificados pela injeção endovenosa de excesso do anestésico (pentobarbital sódico). Os mesmos foram descartados conforme as orientações da cartilha de descarte de resíduos do sistema FMUSP-HC.

### 3.3.3 Parâmetros funcionais analisados

As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método colorimétrico da antrona. O *clearance* de inulina foi calculado conforme a fórmula abaixo, sendo posteriormente corrigido por 100 g de peso corpóreo do respectivo animal. O *clearance* de inulina foi calculado em cada um dos períodos em que as amostras de urina foram coletadas, utilizando-se as concentrações de inulina urinária nesses períodos e a concentração média plasmática de inulina (média das amostras de sangue coletadas no início e no fim do experimento). Como a inulina é totalmente filtrada e praticamente não é secretada nem absorvida ao longo do túbulo renal, o *clearance* de inulina é experimentalmente utilizado como estimativa da taxa

de filtração glomerular. A fórmula abaixo foi utilizada para cálculo do *clearance* de inulina ( $Cl_{\text{Inulina}}$ ), a partir da concentração de inulina na urina e plasma, e do fluxo urinário ( $V_u$ ):

$$Cl_{\text{Inulina}} = [\text{inulina}]_u \times V_u / [\text{inulina}]_p$$

Considerando a relação  $P = F \times R$ , a resistência vascular renal (RVR) foi calculada dividindo a PAM pelo FSR, e o resultado foi expresso em mmHg/mL/min. A fração de excreção de água foi calculada pelo volume urinário (mL/min) dividido pelo *clearance* de inulina, corrigido por 100 gramas de peso.

### 3.4 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma)
- Ácido perclórico (Sigma)
- Ácido sulfúrico (Sigma)
- Antrona (Merck)
- Bicarbonato de sódio (Merck)
- Carbogênio (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>) (White Martins)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)
- Cloreto de mercúrio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Fosfato monossódico (VETEC)
- Glicose (VETEC)
- Heparina sódica (Cristália)
- Inulina (Sigma)
- L-Fenilefrina, Hidrocloridrato (Sigma)
- Quetamina (Vetnil)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Xilazina (Ceva)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, e mantidas no congelador à  $-20^{\circ}\text{C}$  (fármacos), à  $4^{\circ}\text{C}$  na geladeira (soluções de Krebs e EDTA) e temperatura ambiente (anestésicos). A solução contendo mercúrio que sobroua dos experimentos foi quelada com EDTA e descartada conforme as regras da ANVISA para materiais tóxicos.

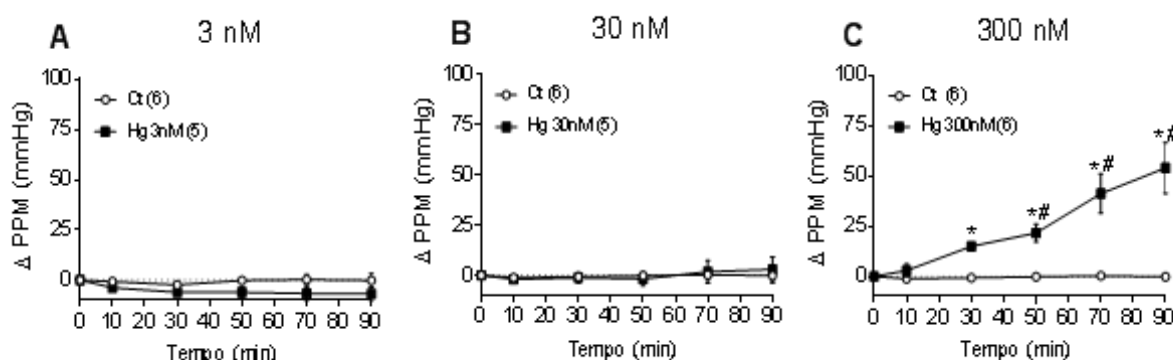
### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E REPRESENTAÇÃO DOS DADOS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes sempre que  $P < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As respostas vasoconstritoras do leito vascular renal foram expressas com variação na pressão de perfusão média ( $\Delta\text{PPM}$ ) em relação à pressão basal, e as respostas vasodilatadoras, como percentual de relaxamento à pré-contracção (% relaxamento). Todos os dados foram previamente submetidos ao teste para avaliação da distribuição normal D'Agostino & Pearson. A análise estatística inferencial dos resultados foi realizada por teste  $t$  de Student pareado ou não-pareado dependendo do contexto, ou por análise de variância (ANOVA) duas vias quando adequado. Para localizar as diferenças na ANOVA, foi feito teste de Bonferroni.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRESSÃO DE PERFUSÃO MÉDIA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO

Com a finalidade de mostrar se o tempo de exposição ao  $\text{HgCl}_2$  afetaria a pressão de perfusão média (PPM) no leito renal de ratos, analisamos nos grupos Ct e Hg os tempos 30 e 90 minutos de exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , nas concentrações 3, 30 e 300 nM, e percebemos que o tempo decorrido no experimento não modifica significativamente a PPM nos rins perfundidos somente com KH. O mesmo ocorreu para as preparações perfundidas com KH adicionada de  $\text{HgCl}_2$ , exceto para aquele grupo Hg 300 nM, evidenciando-se um pequeno aumento na PPM aos 30 minutos, e um expressivo aumento na PPM aos 90 minutos.



**Figura 7:** Análise do delta da pressão de perfusão média ( $\Delta\text{PPM}$ ) do grupo controle (Ct) e mercúrio (Hg), acompanhado ponto a ponto em intervalos de tempo na concentração de 3 nM (90 minutos, A), 30 nM (90 minutos, B) e 300 nM (90 minutos, C). ANOVA duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. Ct. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

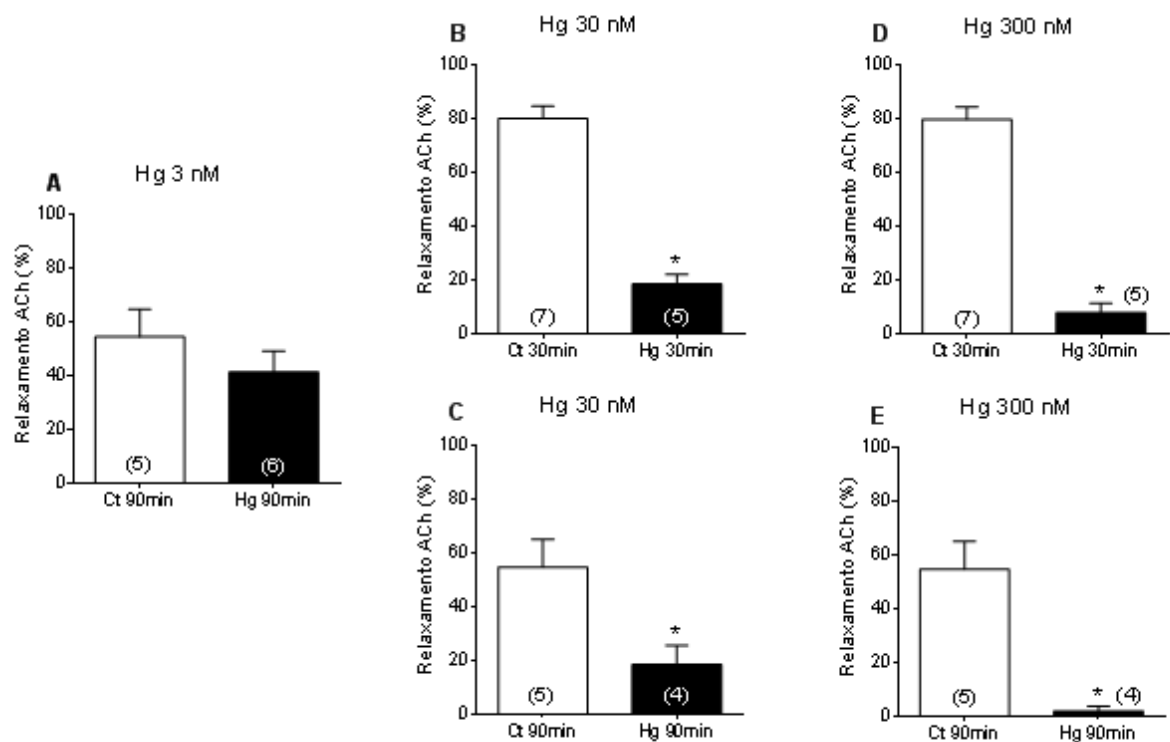
### 4.2 RESPOSTA VASODILATADORA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO

Para avaliar se a exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de alterar o relaxamento dependente do endotélio (estimulado por ACh), foram realizadas pré-contrações com FE na solução KH (concentração final  $10^{-6}$  M) seguidas de perfusão com ACh (concentração final de  $2 \times 10^{-6}$  M) avaliando-se o percentual de relaxamento.

Os leitos renais perfundidos com  $\text{HgCl}_2$  por 30 e 90 minutos tiveram um significativo prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente quando comparados



aos rins perfundidos somente com KH pelos mesmos períodos, exceto na concentração de 3 nM  $\text{HgCl}_2$ . Nas preparações expostas a 30 nM de  $\text{HgCl}_2$  nos tempos 30 e 90 minutos houve uma redução do relaxamento à ACh de 77% e 67% (Figura 8 B e C, respectivamente). Quando analisamos o efeito do  $\text{HgCl}_2$  a 300 nM perfundido por 30 minutos (figura 8 D) percebemos uma maior diminuição do relaxamento à ACh (90% de perda da capacidade relaxante), e nas preparações perfundidas por 90 minutos, houve uma redução quase que total da vasodilatação induzida pela ACh (97%) (figura 8 E).

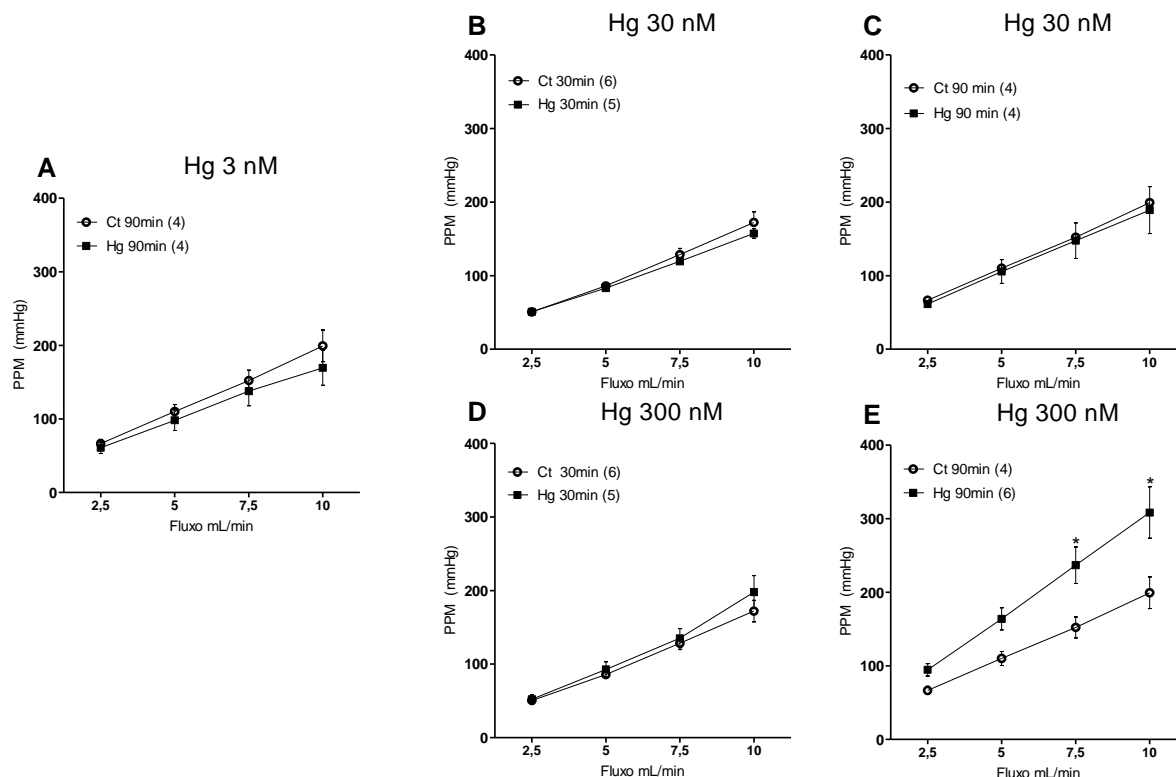


**Figura 8:** Resposta dilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (ACh) no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (Ct) e mercúrio (Hg) na concentração de 3 nM (90 minutos, A), 30 nM (30 e 90 minutos, B e C, respectivamente) e 300 nM (30 e 90 minutos, D e E, respectivamente). Os resultados estão expressos em relação à porcentagem de relaxamento à ACh em relação à pré-contracção com FE. Teste t de Student para comparação de médias. \*P<0,05 vs. Ct. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

### 4.3 RELAÇÃO ENTRE FLUXO E PRESSÃO NO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO

Com a intenção de avaliar os efeitos da exposição aguda do  $\text{HgCl}_2$  sobre a resposta do leito vascular renal de ratos a estímulos físicos tais como o estresse de cisalhamento (*shear stress*), realizamos aumentos de fluxo na bomba peristáltica, 2,5; 5; 7,5 e 10 mL/min, com duração de 2 minutos cada, analisando o aumento equivalente na PPM. Para esse protocolo, foi possível executar duas curvas fluxo-pressão no mesmo leito renal, uma antes e outra após a perfusão do  $\text{HgCl}_2$  para cada uma das concentrações e tempos de exposição. Para cada aumento de fluxo na bomba peristáltica houve aumento na PPM do leito renal.

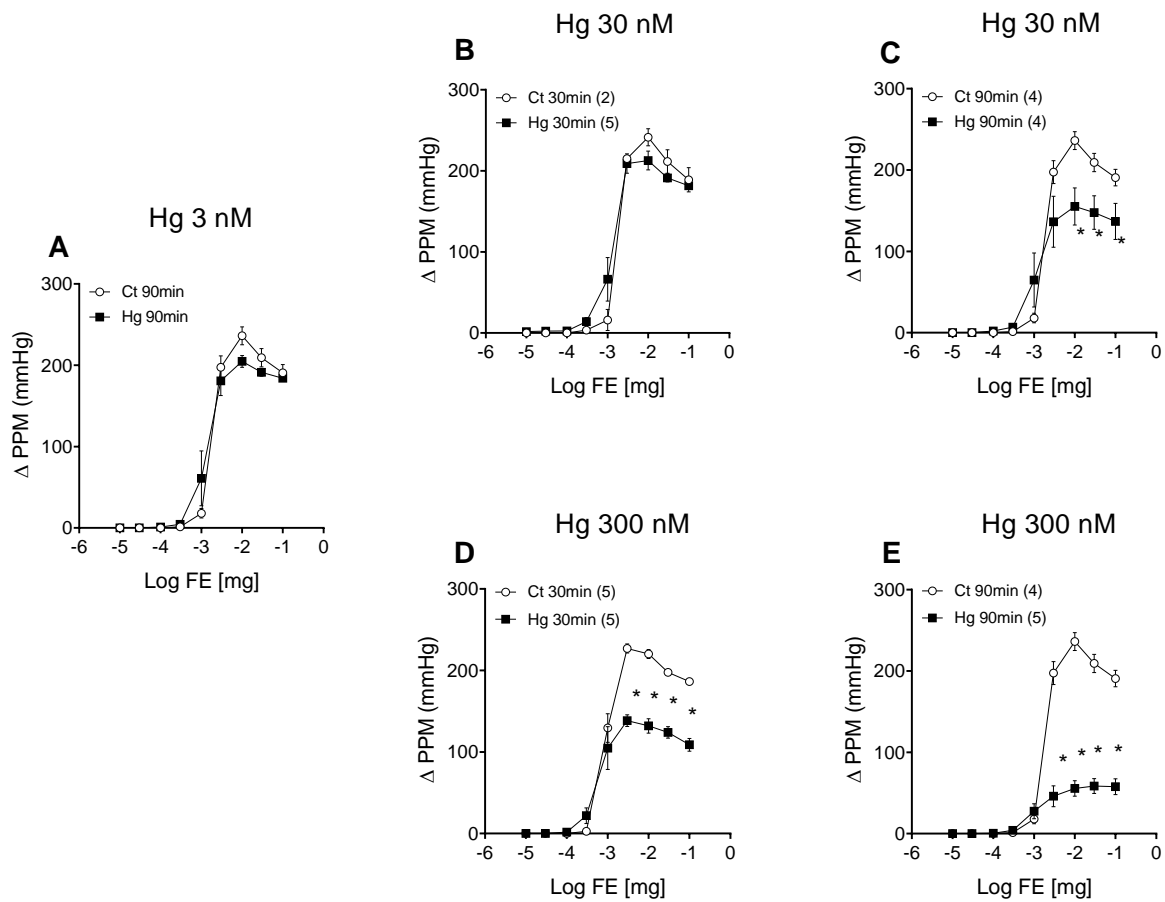
A Figura 9 A, B e C mostra que na concentração de 3 e 30 nM de  $\text{HgCl}_2$ , não houve diferença em nenhum dos tempos de perfusão avaliados. O mesmo foi notado após perfusão por 30 minutos na maior concentração de  $\text{HgCl}_2$  300 nM (figura 9 D). No entanto, nos leitos renais perfundidos com  $\text{HgCl}_2$  a 300 nM por 90 minutos, houve um aumento significativo na relação entre fluxo e pressão (figura 9 E).



**Figura 9:** Curva fluxo  $\times$  pressão no leito vascular renal de ratos nos grupos controle (Ct) e mercúrio (Hg) em intervalos de tempo na concentração de 3nM (90 minutos, A), 30 nM (30 e 90 minutos, B e C, respectivamente) e 300 nM (30 e 90 minutos, D e E, respectivamente). ANOVA duas vias seguida de teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. Ct. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

#### 4.4 RESPOSTA VASOCONSTRITORA DO LEITO VASCULAR RENAL ISOLADO

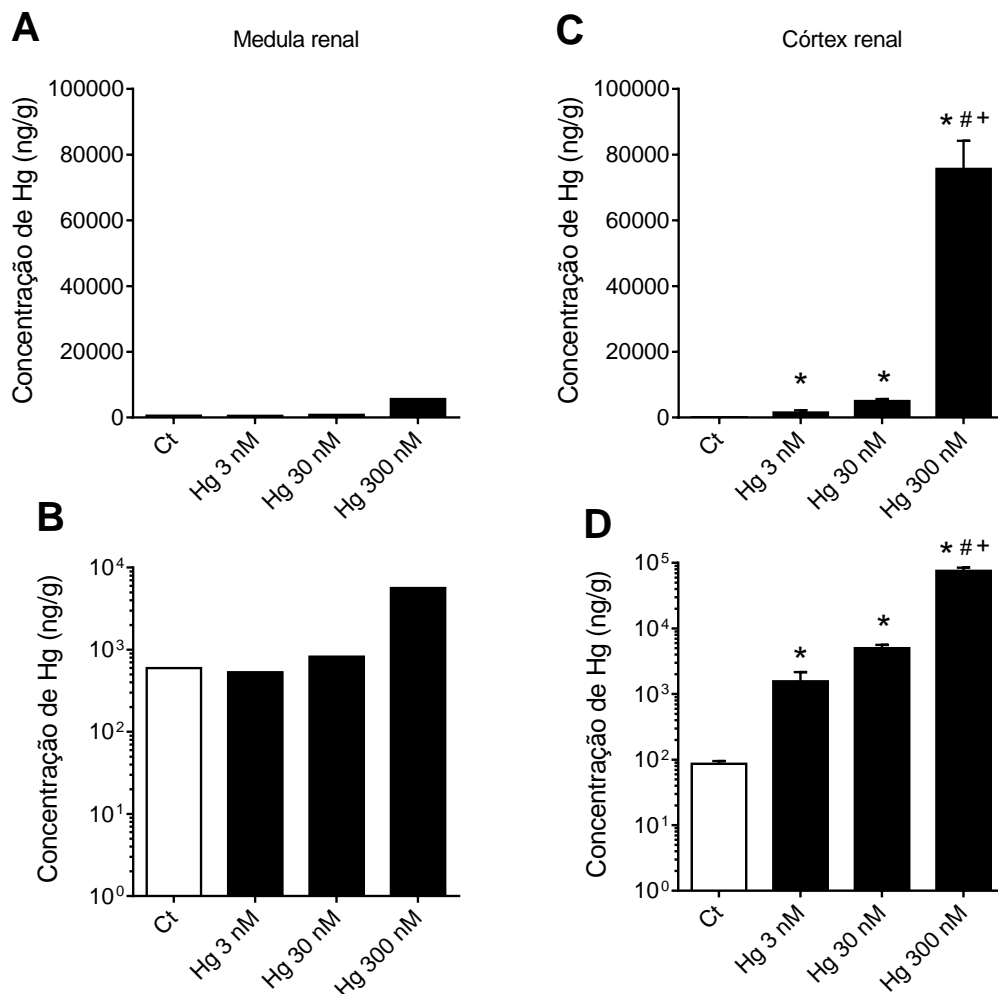
A resposta à fenilefrina está demonstrada na figura 10. Não houve diferença significativa no tempo 90 minutos na concentração 3 nM e nem no tempo 30 minutos com 30 nM  $\text{HgCl}_2$ . Porém há uma redução da resposta após 90 minutos com  $\text{HgCl}_2$  30 nM. Posteriormente, comparamos os grupos Ct e Hg 300 nM nos dois intervalos de tempo de exposição. A perfusão por 30 minutos com  $\text{HgCl}_2$  foi capaz de prejudicar principalmente a resposta máxima atingida (efeitos mais significantes nas últimas doses). Finalmente, a perfusão por 90 minutos com  $\text{HgCl}_2$  deprimiu de maneira ainda mais intensa a resposta contrátil do leito vascular renal.



**Figura 10:** Resposta contrátil induzida por fenilefrina (FE) no leito vascular renal nos grupos controle (Ct) e mercúrio (Hg) em intervalos de tempo na concentração de 3 nM (90 minutos, A), 30 nM (30 e 90 minutos, B e C, respectivamente) e 300 nM (30 e 90 minutos, D e E, respectivamente). Os resultados estão expressos em relação ao delta da contração da pressão de perfusão média ( $\Delta\text{PPM}$ ). ANOVA duas vias seguida de teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. Ct. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO NO RIM PERFUNDIDO COM HgCl<sub>2</sub>

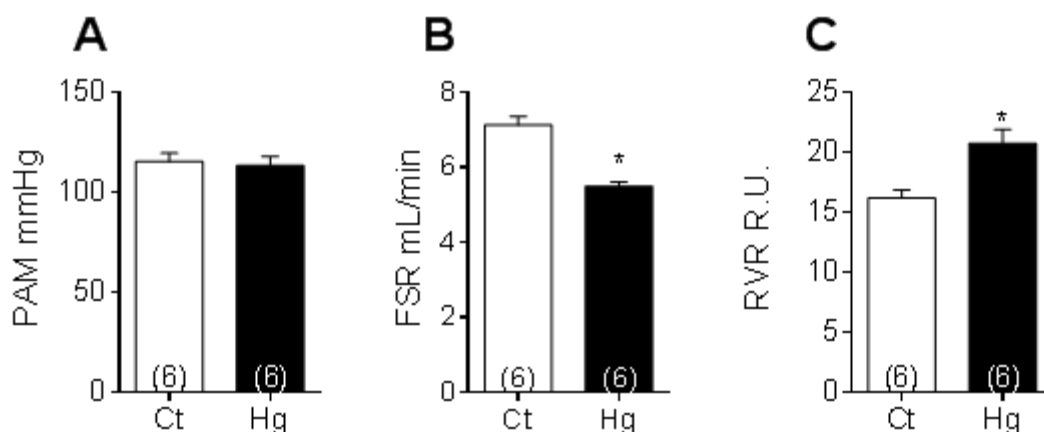
Com a intenção de detectar o teor de mercúrio no parênquima renal após os rins serem isolados e perfundidos por 90 min. em três concentrações diferentes (3, 30 e 300 nM HgCl<sub>2</sub>) comparamos os grupos Ct e Hg 3, 30 e 300 nM em relação ao córtex e medula renal. Percebemos que há uma significativa diferença em relação ao depósito de mercúrio nos grupos Ct e Hg 3, 30 e 300 nM, principalmente no córtex renal, e que essa diferença cresce ao passo que se aumenta a concentração de mercúrio (depósito dose-dependente). O grupo Hg 300 nM deposita mais mercúrio que o grupo Hg 30 nM, que deposita mais mercúrio que o grupo Hg 3 nM. O teor de mercúrio depositado é relativamente maior no córtex renal do que na medula renal.



**Figura 11:** Teor de mercúrio depositado na medula renal (A e B) e no córtex renal (C e D) após perfusão com cloreto de mercúrio em três concentrações diferentes (3, 30 e 300 nM HgCl<sub>2</sub>). ANOVA 1 via seguida de teste de Bonferroni. \*P<0,05 vs. Ct, #P<0,05 vs. Hg 3nM, e +P<0,05 vs. Hg 30 nM.

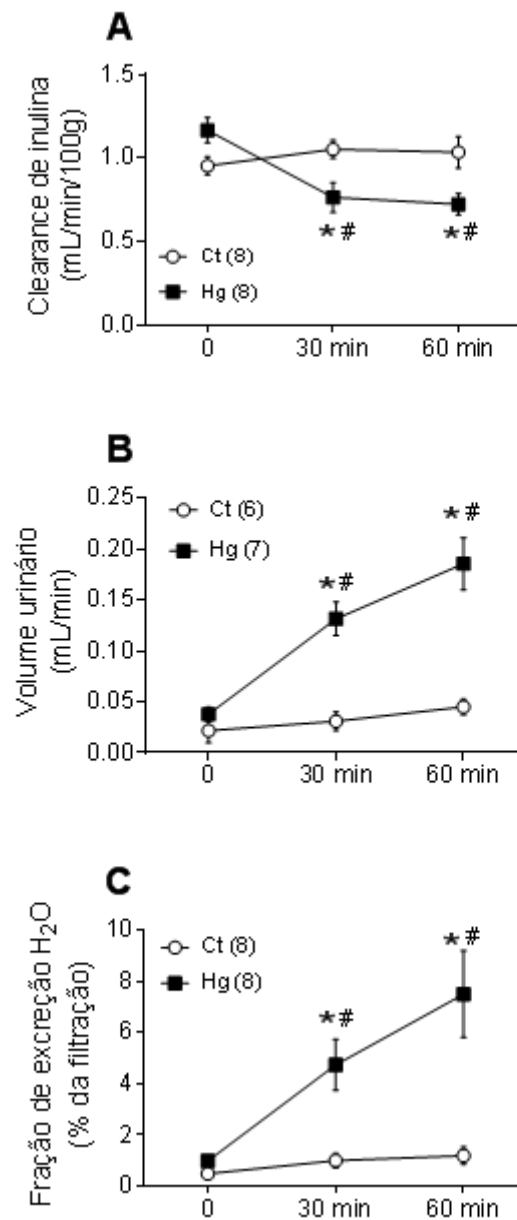
#### 4.6 ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL NO ANIMAL *IN VIVO*

Com a finalidade de avaliar os efeitos agudos da exposição ao  $\text{HgCl}_2$  sobre a função renal do animal *in vivo*, comparamos animais expostos ou não ao mercúrio por 90 minutos e verificamos a pressão arterial média (PAM), o fluxo sanguíneo renal (FSR), a resistência vascular renal (RVR), a taxa de filtração glomerular (TFG), o volume urinário (VU) e a fração de excreção de água ( $\text{FEH}_2\text{O}$ ) entre estes animais. Percebemos que não houve diferença na PAM entre os grupos Ct e Hg ao fim do experimento (Figura 12 A). Entretanto, houve uma queda no FSR dos animais do grupo Hg (Figura 12 B), e quando analisamos a RVR (razão da PAM pela FSR) há um aumento desta nos animais do grupo Hg (Figura 12 C).



**Figura 12:** Efeitos agudos do cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na pressão arterial média (PAM) (A), no fluxo sanguíneo renal (FSR) (B) e na resistência vascular renal (RVR) (C). Teste t de Student \* $P < 0,05$  vs. Ct. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

É perceptível também nos animais expostos ao mercúrio uma diminuição da TFG e um aumento do VU, bem como, uma maior  $\text{FEH}_2\text{O}$  na urina (figura 13 A, B e C, respectivamente).



**Figura 13:** Efeitos agudos do cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) na taxa de filtração glomerular (TFG) estimada pelo *clearance* de inulina (A), no volume urinário (VU) (B) e na fração de excreção de água ( $\text{FEH}_2\text{O}$ ) expressa como % da filtração (C). O número de animais usados está indicado entre parênteses. ANOVA 2 vias seguida de teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  vs. Ct, # $P < 0,05$  vs. 1ª coleta (tempo 0).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a exposição de forma aguda ao  $\text{HgCl}_2$ , nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, altera a vasculatura renal. Essa alteração foi simultânea à diminuição da filtração glomerular e a um aumento da diurese. No grupo 300 nM 90 minutos, houve aumento da resistência vascular renal que, nos experimentos *in vitro* estava associado a disfunção endotelial e exacerbação da resposta pressórica aos altos fluxos.

Neste estudo avaliamos *in vivo* os impactos da injeção aguda de  $\text{HgCl}_2$  sobre a função renal de ratos, e os efeitos da infusão aguda com  $\text{HgCl}_2$  na reatividade do leito vascular renal isolado. Sabe-se que os efeitos tóxicos de várias substâncias, incluindo metais pesados, dependem da sua concentração e do tempo de exposição, da forma física e química do elemento, da via de administração e/ou absorção e do padrão de metabolização e/ou excreção (ZALUPS, 2000). Em outras palavras, o mercúrio possui seu caráter tóxico dependente da interação com o organismo através da absorção, pelo transporte, distribuição, transformação, acumulação e/ou excreção pelo organismo. Apesar de se acumular em diferentes órgãos e sistemas, a eliminação de mercúrio inorgânico é feita principalmente através dos rins, e os mesmos apresentam grande fluxo sanguíneo (25% do débito cardíaco) e intensa atividade enzimática (PASSOW et al., 1961; ZALUPS 1993; VAN VLEET; SCHNELLMANN, 2003). Dessa maneira, é natural imaginar que o metal exerça efeitos tóxicos particularmente neste sítio (ZALUPS et al., 1995a, 1995b, 2000).

Analisando primeiramente a PPM do leito vascular renal isolado, percebe-se que ambos, concentração e tempo de exposição ao mercúrio, influenciam no seu aumento, havendo significativo aumento da PPM nos rins perfundidos com  $\text{HgCl}_2$  tanto concentração- quanto tempo-dependente. Considerando que neste protocolo a vazão é constante (fluxo constante), o aumento da PPM está relacionado ao aumento na resistência vascular do leito renal, seja por estimular uma vasoconstrição, seja por inibir alguma modulação vasodilatadora. De fato, como mostrado por Machado et al. 2007, o mercúrio administrado agudamente em doses

baixas (680 ng/kg) provoca aumento da pressão arterial de ratos, o que pode acontecer em decorrência não só de efeitos cardíacos, mas também vasculares.

Sugerindo uma possível redução na ação moduladora do endotélio sobre o tônus vascular do leito renal, houve um significativo prejuízo no relaxamento dependente do endotélio via ACh, já após 30 minutos com a infusão a 30 nM HgCl<sub>2</sub> e diminuindo conforme aumentou-se o tempo e a concentração do HgCl<sub>2</sub>. Assim, poderíamos supor que a exposição ao HgCl<sub>2</sub> poderia lesionar o endotélio, inibindo a liberação de vasodilatadores endoteliais para o músculo liso vascular, ou ainda reduzindo a biodisponibilidade desses vasodilatadores.

Sabe-se que o endotélio utiliza três vias (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF) para induzir o relaxamento no MLV, e que essas vias podem vir a ser recrutadas ou superreguladas a fim de manter a homeostase vascular em situações de danos em outras vias. A importância relativa desses três fatores vasodilatadores derivados do endotélio, bem como sua interação, varia conforme o sítio na vasculatura e também na dependência do estado patológico envolvido, visto que é frequente a identificação da intensidade de uma ou mais vias para compensação ao prejuízo de outras (BATLOUNI et al., 2001; CERQUEIRA; BONETTI, 2002; AIRES et al., 2008).

Já é conhecido que o NO exerce importante papel na função vascular, como a modulação da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar a musculatura lisa (CERQUEIRA; BONETTI, 2002). A liberação de NO pelo endotélio é essencial para o relaxamento endotelial mediado por estímulos químicos, como a ACh, bem como por estímulos físicos, tais como o arraste ou cisalhamento do sangue sobre a superfície da célula endotelial (RANJAN et al., 1995; SMALT et al., 1997; LEMOS et al., 2009).

Para ampliar a investigação dos impactos do mercúrio sobre a vasomoção do leito renal, foi realizada a análise da curva fluxo × pressão, e percebeu-se que somente no maior tempo de exposição e sob maior concentração, houve mudança no comportamento da PPM em resposta ao aumento do fluxo. Sabe-se que frente a estímulos físicos, como no caso do estresse de cisalhamento (*shear stress*) causado pelo aumento de fluxo, a liberação de NO pelo endotélio é essencial para a homeostase circulatória. Avaliando a relação  $P = F \times R$  e considerando um tubo rígido e imóvel, quando aumentamos o fluxo, é natural que a pressão aumente.



Entretanto nos vasos sanguíneos temos não só a distensibilidade natural de sua parede (complacência vascular), mas também as modificações no tônus do MLV. Assim, se por um lado o MLV se contrai no vaso submetido a aumento do fluxo (resposta miogênica), o que aumentaria ainda mais a P frente ao aumento de F, devido à liberação endotelial de NO por meio do *shear stress* em fluxos altos, esse aumento de P é negativamente modulado (AIRES et al., 2008).

Considerando que nossos resultados mostram que há uma exacerbação da resposta da PPM ao aumento de F do grupo Hg 300 nM 90 minutos em relação ao seu grupo Ct (90 minutos), isso poderia indicar que, também no recrutamento de uma resposta endotelial por meio *shear stress*, haveria uma diminuição da modulação causada pelo mercúrio. Com isso, podemos especular que o endotélio não estaria conseguindo responder ao *shear stress* e nem liberar o NO para manter a pressão. Todavia, outra explicação não deve ser excluída: que frente ao aumento no fluxo, haveria uma exacerbação da resposta miogênica nas pequenas artérias e arteríolas renais causada pelo mercúrio nessa concentração mais alta (300 nM). A resposta miogênica é um mecanismo intrínseco do MLV que responde, produzindo contração, sempre que há um aumento na tensão da parede do vaso, como por exemplo, num súbito aumento de fluxo. Dessa maneira, não podemos descartar que o mercúrio poderia estar exacerbando esse mecanismo. Como já mencionado, a resposta pressórica frente ao fluxo num leito vascular depende não só da elasticidade do vaso, mas também do tônus miogênico e da liberação de óxido nítrico dependente do fluxo. Como estes três parâmetros podem influenciar a resposta miogênica, não se pode afirmar que ela está aumentada no grupo mercúrio.

Em outros leitos vasculares, o mercúrio causa disfunção endotelial com diminuição da biodisponibilidade do NO, sendo este devido ao aumento do estresse oxidativo e produção de radicais livres derivados do oxigênio (ânion superóxido, radical hidroxila, peroxinitrito, entre outros) (WIGGERS et al., 2008; FURIERI et al., 2011). Esses autores evidenciam um fator comum como consequência da disfunção endotelial: o aumento da resposta vasoconstritora.

Igualmente, como nossos resultados mostraram redução da vasodilatação endotélio-dependente, aumento da PPM ao longo do tempo de perfusão na mais alta concentração de HgCl<sub>2</sub>, e maior aumento de PPM frente aos aumentos de fluxo,

seria de se esperar uma hiperreatividade vascular à FE como consequência da disfunção endotelial no leito vascular renal. Todavia, a resposta vasocontrátil não foi aumentada pelo mercúrio, mas, pelo contrário, foi diminuída.

Embora não tenhamos exatamente uma explicação definitiva para a resposta vasocontrátil diminuída no leito vascular renal à Fenilefrina decorrente da exposição ao mercúrio, poderíamos traçar algumas especulações:

- O mercúrio pode reduzir a disponibilidade de NO como tipicamente descrito por aumentar o estresse oxidativo. Porém se forem gerados metabólitos vasodilatadores, como  $H_2O_2$  (LUND et al., 1993), estes se oporiam a resposta vasoconstritora da FE;
- O mercúrio estaria agindo sobre a via ativada pelo receptor alfa adrenérgico na musculatura lisa vascular, reduzindo a resposta a FE;
- O mercúrio prejudicaria não só a função endotelial, mas também a capacidade do músculo liso em contrair e relaxar. Particularmente, considerando que a curva de FE era o último protocolo a ser realizado, pode ser que esse tempo adicional de exposição (aproximadamente 30-40 minutos) tenha sido prejudicial.

Posteriormente aos protocolos de perfusão do órgão isolado, separamos amostras de rins para detectar o teor de mercúrio no parênquima renal pela técnica de ICP-MS. Analisando os resultados é perceptível que há um maior depósito de mercúrio no córtex do que na medula renal, e que este é maior nas concentrações maiores. Na verdade, era esperada essa maior detecção de mercúrio no córtex do que na medula renal, visto que a região cortical do rim possui um fluxo sanguíneo renal maior (90% do FSR), além dos glomérulos e túbulos proximais. Nesse sentido, sabe-se que dentro do rim, o túbulo proximal é o principal local de captação e acumulação de espécies mercuriais (ZALUPS, 2000), e que neste sítio há transporte de íons de mercúrio predominantemente através de transportadores específicos de aminoácidos ou de aniônicos orgânicos (OAT 1 e 3) (KOJIMA et al., 2002; MOTOHASHI et al., 2002).

Seguindo esta linha de raciocínio, também se poderia supor que há uma maior participação da região cortical do rim em relação aos efeitos agudos do

mercúrio, tendo em vista que nesta região há uma maior presença de artérias arqueadas, interlobulares e glomérulos, consequentemente, maior número de arteríolas aferentes e eferentes. Estes vasos, particularmente as arteríolas possuem grande participação no controle da regulação da resistência vascular renal, visto que são locais de maior resistência ao fluxo sanguíneo. Sabendo disso, acreditamos que no aumento da PPM nos rins perfundidos com mercúrio no maior tempo e concentração, teve a participação direta da constrição dos vasos de resistência, aumentando a resistência deste sistema avaliado *in vitro*.

Após essas análises *in vitro*, foram realizados os protocolos *in vivo* de análise dos efeitos do mercúrio, com a finalidade de avaliar se o maior tempo e concentração de mercúrio exposto no rim de forma aguda, iria ocasionar alterações na hemodinâmica e função renal do animal.

Primeiramente, não houve significativa diferença na PAM entre os animais Ct e Hg. Apesar disso, os animais expostos ao mercúrio tiveram uma diminuição no FSR, reflexo de um aumento na RVR, provavelmente por consequência de uma ação vasoconstritora nos vasos de resistência. Esse fato está em concordância com as análises *in vitro* com o aumento da PPM no rim isolado quando se mantém o fluxo constante (isto é, houve aumento na resistência). Como mostrado por Girardi em 1989, a intoxicação aguda com mercúrio pode de fato trazer alterações no fluxo plasmático renal após uma hora de exposição. Neste estudo foi observado diminuição no fluxo renal em animais tratados com alta dose (5 mg/kg) de  $\text{HgCl}_2$ . Outra justificativa que reforça o aumento da RVR é o efeito *in vitro* do mercúrio, inibindo a modulação da função endotelial, ora por reduzir a resposta vasodilatadora à ACh, ora por modificar a resposta do leito vascular ao aumento do *shear stress*.

Além da diminuição no FSR e aumento na RVR, em consequência, os animais que receberam a injeção de  $\text{HgCl}_2$  tiveram diminuição na TFG, provavelmente por causa de uma ação vasoconstritora maior na arteríola aferente do que na eferente, pois se houvesse maior vasoconstrição na arteríola eferente a TFG aumentaria devido ao aumento da pressão hidrostática do capilar glomerular. Vários estudos epidemiológicos relataram evidências de lesão renal após exposição aguda e crônica a várias formas de mercúrio (POLLACK et al., 2015; HA et al., 2016). A exposição a doses moderadas ou altas de  $\text{HgCl}_2$  resulta em necrose celular

ao longo da parte reta, convoluta e distal do néfron (McDOWELL et al., 1976; ZALME et al., 1976; ZALUPS et al., 2014). Além disso, a exposição a espécies mercuriais também pode resultar em alterações nos glomérulos, causando glomerulonefrite, e também lesões tubulointersticiais e fibrose (LI et al., 2010; ZALUPS et al., 2014). Sendo assim, é de se esperar que após a exposição ao mercúrio, haja uma diminuição na TFG (McDOWELL et al. 1976; VANHOLDER et al. 1982). Não obstante, de acordo com nossos resultados, as reduções na TFG causada pelo mercúrio poderiam ser decorrentes das alterações estruturais patológicas no glomérulo, mas também devido a alterações na hemodinâmica do capilar glomerular.

Os animais expostos ao mercúrio também apresentaram um aumento no débito urinário (produção de urina) e maior fração de excreção de água, possivelmente devido a uma menor reabsorção de água nas porções tubulares. Isso pode estar relacionado ao fato de o mercúrio possuir efeitos diuréticos, já há muitas décadas estudados. Esse efeito diurético do mercúrio, além de diminuir a reabsorção de água nas partes proximais do néfron, também poderia interferir na bomba de sódio da membrana basolateral e transportadores de íons na membrana luminal do segmento espesso da alça de Henle, o que levaria a dispersão da hiperosmolaridade da medula renal e redução do gradiente para reabsorção de água nos túbulos coletores. Em última análise, outro possível sítio de ação seria agindo sobre as aquaporinas-2 nos túbulos coletores, inibindo sua incorporação, ativação ou abertura.

Sabe-se que os diuréticos mercuriais são compostos contendo íons de mercúrio orgânico capazes de serem filtrados nos túbulos renais e liberar íons mercúrico livres ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Promovem diurese, consequência direta da liberação do íon  $\text{Hg}^{2+}$  livre na urina ácida, e neste caso uma maior quantidade de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) é liberado para a região distal do néfron, podendo aumentar a excreção de potássio ( $\text{K}^+$ ) e hidrogênio ( $\text{H}^+$ ); inibem o transporte ativo de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), especialmente no ramo ascendente da alça de Henle; assim, a reabsorção é diminuída e mais  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são excretados (Cray, 2014). Enquanto essa menor reabsorção de solutos aumenta a osmolaridade do filtrado, ao mesmo tempo altera o mecanismo de contracorrente e, consequentemente, a hipertonicidade da medula renal, o que reduz ainda mais o gradiente osmótico para reabsorção de água. De fato, um estudo

desenvolvido por Griggs e Johns em 1948, mostrou que indivíduos com insuficiência cardíaca e dieta hipossódica, a administração de um diurético mercurial (Mercurhydrin) eleva a concentração de  $\text{Na}^+$  na urina em 2,5 vezes,  $\text{Cl}^-$  em 3,5 vezes, além de reduzir em 40% a concentração urinária de  $\text{K}^+$ , em 24 h após administração do composto mercurial. Dale et al., em 1954, também mostraram que outro diurético mercurial (Mersalyl) inibe a reabsorção de sódio, cloreto e água no túbulo distal em humanos.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que a exposição de forma aguda ao  $\text{HgCl}_2$ , tanto nos animais quanto na preparação de rim isolado e perfundido, altera a hemodinâmica renal. Essa alteração na hemodinâmica foi concomitante à diminuição da filtração glomerular e a um aumento da diurese. Em relação aos efeitos hemodinâmicos, podemos sugerir que no grupo 300 nM 90 minutos, houve aumento da resistência vascular renal que, nos experimentos *in vitro* estava associado a disfunção endotelial e exacerbação da resposta pressórica aos altos fluxos. Com isso, poderíamos sugerir que a falência renal aguda induzida pela intoxicação com  $\text{HgCl}_2$  deve ser, pelo menos em parte, devido aos seus efeitos sobre a motricidade da vasculatura renal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Brasil: Guanabara Koogan, 2008.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for mercury**. Washington (DC): ATSDR, Public Health Service, US Department of health and human services: 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pediatric/appendixb.html>.

ALEXANDRE, S. C. **Avaliação de área contaminada por mercúrio total em Descoberto, MG**. 2006. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006.

ASANO, S., et al. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. **Pathology International**, v. 50, n.3, p. 169-174, 2000.

AZEVEDO, B. F. **Efeitos da Exposição Crônica a Diferentes Concentrações de Cloreto de Mercúrio em Vasos de Condutância e Resistência**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2016.

AZEVEDO, B. F., et al. Chronic mercury exposure at different concentrations produces opposed vascular responses in rat aorta. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 43, n.7, p.712-719, 2016.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2003.

BALLATORI, N., et al. Biliary secretion of glutathione and of glutathionemetal complexes. **Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 816-831, 1985.

BARREGARD, L., et al. Enzyuria in workers exposed to inorganic mercury. **Archives of Environmental Health**, v. 61, n. 1, p.65-69, 1988.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001.

Blogspot, Controle de Pragas. Disponível em: <http://gravetomarquescruz.blogspot.com/p/controlo-de-pragas.html>. Acesso em 18 de junho de 2018.

- BECKER, C. Nephrotic syndrome after contact with mercury. **Archives of Environmental Health**, v. 110, n. 2, p.178-186, 1962.
- BENOV, L. C., et al. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. **Chemico-biological interactions** v.76, n.3, p. 321-332, 1990.
- BERNARD, A., et al. Epidemiological application of early markers of nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, v.46 n.3, p. 293-306, 1989.
- BERNE et al. **Fisiologia**. 6.<sup>a</sup> ed. Brasil: Elsevier, 2009.
- BOHETS, H. H. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells. **Kidney international**, v. 47, n.2, p. 395-403, 1995.
- BOENING, D. W., et al. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1335-1351, 2000.
- BRIDGES, C. C. Glutathione status and the renal elimination of inorganic mercury in the Mrp2(-/-) mouse. **Public Library of Science one**, v.8, n.9, p. 735-759, 2013.
- BRIDGES, C. C., et al. The aging kidney and the nephrotoxic effects of mercury. **Journal of toxicology and environmental health**, v. 20, n. 2, p.55–80, 2017.
- BRODKIN, E., R. Lead and mercury exposures: interpretation and action. **Canadian Medical Association Journal**, v. 176, n.1, p.59-63, 2007.
- BURTON, C. A. Glutathione effects on toxicity and uptake of mercuric chloride and sodium arsenite in rabbit renal cortical slices. **Environmental health perspectives**, v.103, n.1, p.81-84, 1995.
- CARDOSO, F. A., et al. Endotélio vascular. Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas**, v.3, n.3, p.76-84, 1994.
- CARMIGNANI, M., et al. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganix mercury in rats. **British journal of industrial medicine**, v.49, n.4, p. 226-232, 1992.
- CANNON, V. T., et al. Molecular homology and the luminal transport of Hg<sup>2+</sup> in the renal proximal tubule. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.11, n. 3, p.394–402, 2000.

CANNON, V. T., et al. Amino acid transporters involved in luminal transport of mercuric conjugates of cysteine in rabbit proximal tubule. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.298, n.2, p.780–789, 2001.

Carta Capital, O câmbio e a indústria. Disponível em: <<https://www.cartacapital.com.br/revista/941/o-cambio-e-a-industria>>. Acesso em 18 de junho de 2018.

CERQUEIRA, N. F., et al. Óxido Nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 34, n. 4, p. 4369-4403, 1997.

CLARKSON, T. W., et al. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American journal of industrial medicine**, v. 50, n.10, p.757-64, 2007.

CRAY, M. I. Mercurial Diuretics 7Raff RB, Rawls SM, Beyzarov EP. **Netter's Illustrated Pharmacology**, Updated Edition. Saunders, 2014.

CUNHA, M. E. S. **Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos**. 2008. Dissertação (doutorado em Ciências Biomédicas). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto. 2008.

Da CUNHA, V., et al. Effects of mercury on the isolated perfused rat tail vascular bed are endothelium-dependent. **Archives of environmental contamination and toxicology**, n.39, v.1, p.124-130, 2000.

DALE, R. A., et al. The mode of action of a mercurial diuretic in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.33, n.7, p.1008–1014, 1954.

DAVIDSON, P. W., et al. Prenatal methyl mercury exposure from fish consumption and child development: a review of evidence and perspectives from the Seychelles Child Development Study. **Neurotoxicology**, v.27, n.6, p.1106-1109, 2006.

DEANFIELD, J. E., et al. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v.115, n.101, p.1285-1295, 2007.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USA. **Mercury Study Report to Congress: Volume II: An Inventory of Anthropogenic Mercury Emissions in the United States**, Washington, DC, 1997.



EKAWANTI, A., et al. Effect of Mercury Exposure on Renal Function and Hematological Parameters among Artisanal and Small-scale Gold Miners at Sekotong, West Lombok, Indonesia. **Journal of Health & Pollution**, v.5, n. 9, p. 25-32, 2015.

EKINO, S., et al. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, n.2, p.131–144, 2007.

Estudo Prático, Entenda o porquê das nuvens de chuva serem cinza. Disponível em: <<https://www.estudopratico.com.br/entenda-o-porque-das-nuvens-de-chuva-serem-cinza/>>. Acesso em 18 de junho de 2018.

FDA – United States Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/fdama/mercuryreport.htm>.

FISHBEIN, L. Chromatographic and biological aspects of organic mercury.

**Chromatographic Reviews**, v.15, p. 195-238, 1971.

FORSTERMANN, U., et al. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v.113, n.13, p.1708–1714, 2006.

FURCHGOTT, R. F., et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**. v. 24, p. 175-197, 1984.

FURCHGOTT, R. F., et al. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.3, n.9, p. 2007-2018, 1989a.

FURCHGOTT, R. F., et al. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, p.2007-2018, 1989b.

FURCHGOTT, R. F., et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, p.373-376, 1980.

FURIERI, L. B., et al. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.162, n.8, p. 1819-1831, 2011.

GANTHER, H. E. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 355, p. 212–226, 1980.

GILMAN, A. G., et al. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Brasil, 2007.

GOLDWATER, L. J. **Mercury: a history of quicksilver**. 1 ed. New York: York Press, 1972.

GINÉ, M. F., et al. Determinações multi-elementares de metais, sulfato e cloreto em amostras de águas por espectrometria de massa. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 414-417, 1998.

GIRARDI, G., et al. Effectiveness of *N*-acetyl-cysteine in protecting mercuric chloride nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 67, p. 155-164, 1991.

GIRARDI, G., et al. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 61-66, 1995.

GIRARDI, G., et al. The implication of renal glutathione levels on mercuric chloride nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 58, p. 187-195, 1989.

GIUBERTI, K. et al. **Efeitos da exposição crônica a baixas concentrações de cloreto de mercúrio (20  $\eta$ M) sobre o sistema cardiovascular de ratos**. Tese de Doutorado, 2010. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

GRIENDLING, K. K., et al. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRIGGS, D. E., et al. Influence of Mercurial Diuretics on the Excretion of Sodium, Potassium and Chlorides. **California Medicine**, v. 69, p. 133-137, 1948.

GRITZKA, T. L., et al. Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Electron microscopic observations: Degeneration of the pars recta. **American Journal of Pathology**, v. 52, p. 1225–1277, 1968.

GSTRAUNTHALER, G., et al. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 2969-2972, 1983.

HA, E. Current progress on understanding the impact of mercury on human health. **Environmental Research**, v. 152, p. 419-433, 2017.

HYLANDER, L. D., et al. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. **Science of Total Environment**, v. 304, p. 13-27, 2003.

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. Mercury. In: Toxicology, occupational medicine and environmental series. 2004. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>.

HODGSON, S., et al. Kidney Disease Mortality and Environmental Exposure to Mercury. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, p. 72-77, 2007.

HONG, Y. S., et al. Methylmercury Exposure and Health Effects. **Journal of Preventive Medicine & Public Health**, v. 45, p. 353–363, 2012.

HOUSER, M. T. Glutathione monoethyl ester moderates mercuric chloride-induced acute renal failure. **Nephron**, v. 61, p. 449-455, 1992.

HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 13, p.128-133, 2007.

HUSSAIN, S., et al. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 32, p. 395-409, 1997.

JANSSON, G., et al. Stimulating effects of mercuric-and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. **Free radical research communications**, v. 18, p. 87-98, 1993.

JOHNSON, C. L. Mercury in the Environment: Sources, toxicities, and prevention of exposure. **Pediatric Annals**, v. 33, p. 437-442, 2004.

KOBAL, A., et al. Renal function in miners intermittently exposed to elemental mercury vapour. **Archives of industrial hygiene and toxicology**, v. 51, p. 369-380, 2000.

KOJIMA, R. T., et al. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, p. 848-57. 2002.

LEMOS, N. B. et al. **Exposição aguda a baixa concentração de cloreto de mercúrio induz disfunção endotelial em aorta de ratos**. Dissertação de Mestrado, 2009. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

LI, S. J., et al. Mercury-induced membranous nephropathy: Clinical and pathological features. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p. 439–44. 2010.

LINDBERG, S. E., et al. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. **Ambio**, v. 36, p. 19-32; 2007.

LUND, B. O., et al. Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p.181-187,1991.

LUND, B. O., et al. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v .45, p. 2017-2024, 1993.

MACHADO, AC., et al. Small doses of mercury increase arterial pressure reactivity to phenylephrine in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 92-97, 2007.

MAGOS, L. Physiology and toxicology of mercury. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 34, p. 321-370, 1997.

MAGOS, L., et al. Overview of the clinical toxicity of mercury. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 257–268, 2006.

MAHBOOB, M. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 36, p. 687-697, 2001.

MASSARONI, L., et al. Effects of mercury on the mechanical and electrical activity of the Langendorff-perfused rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 861-864, 1992.

MATURANA, M. A., et al. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics**, v. 62, p. 77-86, 2007.

McDOWELL, E. M., et al. Studies on the pathophysiology of acute renal failure. Correlation of ultrastructure and function in the proximal tubule of the rat following administration of mercuric chloride. **Virchows Archiv. B, Cell Patholog**, v. 22, p. 173–196, 1976.

McKELVEY, W. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York City adults. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 1435–1441, 2007.

MENDONÇA, R., et al. **Como cuidar do seu meio ambiente** - Col. Entenda e Aprenda. 3 ed. Brasil: Bei comunicação, 2010.

MICARONI, R. C. C., et al. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, p. 487-495, 2000.

MONCADA, S., et al. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin), a potent inhibitor of platelet aggregation. **Lancet**, v. 1, p. 18-20, 1977.

MOTOHASHI, H., et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. **Journal of The American Society of Nephrology**, v. 13, p. 866–74, 2002.

NORDBERG, G. F., et al. **Handbook on The Toxicology of Metals**. 4 ed. Amsterdam: Academic Press, 2014.

NRIAGU, J. O., et al. Mercury pollution in Brazil. **Nature**, p. 356-389, 1992.

OLIVERO, J., et al. Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel, Colômbia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 865-870, 1997.

O Sul, Instituto mineiro encontra metais pesados acima do limite no rio Doce. Disponível em: <<http://www.osul.com.br/instituto-mineiro-encontra-metais-pesados-acima-do-limite-no-rio-doce/>>. Acesso em 18 de junho de 2018.

PASSOS, C. J. S., et al. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 503-520, 2008.

PASSOW, H., et al. The general pharmacology of heavy metals. **Pharmacological reviews**, v. 13, p. 185-224, 1961.

PEÇANHA, F. M. **A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) altera a reatividade vascular da aorta de ratos - Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides da via da ciclooxigenase**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

PEÇANHA, F. M, et al. The role of cyclooxygenase (COX)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61,p. 29–36, 2010.

POLLACK, A. Z., et al. Kidney biomarkers associated with blood lead, mercury, and cadmium in premenopausal women: A prospective cohort study. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 78, p. 19–31, 2015.

REMUZZI, G., et al. Pathophysiology of progressive nephropathies. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1448-1456, 1998.

RANJAN, V., et al. Cultured endothelial cells is elevated by fluid *shear stress*. **Physiology Published**, v. 269, p. 550-555, 1995.

RIBAROV, S. R., et al. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 640, p. 721-726, 1981.

RODIN, A. E., et al. Mercury nephrotoxicity in the rat. 2. Investigation of the intracellular site of mercury nephrotoxicity by correlated serial time histologic and histoenzymatic studies. **American Journal of Pathology**, v. 41, p. 485–99. 1962.

ROSALES, P. C., et al. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptoticmechanism of damage. **Toxicology**, v. 210, p. 111-121, 2005.

ROSSONI, L. V., et al. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p. 887-892, 1999.

SALONEN, J. T., et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. **Circulation**, v. 91, p. 645-655, 1995.

SALONEN, J.T., et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**, v. 148, p. 265–273, 2000.

SCHECHTER, A. N., et al. Hemoglobin and the paracrine and endocrine function of nitric oxide. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1483-1485, 2003.

SMALT, R., et al. Constitutive NOS expression in American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 751-758, 1997.

SOUZA, J. R., et al. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. **Química Nova na Escola**, p. 3-7, 2000.

STOHS, S. J., et al. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SZASZ, T., et al. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. **Experimental Biology And Medicine**, v. 232, p. 27-37, 2007.

SU, J., et al. The effects of methylmercury on isolated cardiac tissues. **American Journal of Pathology**, v. 95, p. 753-764, 1979.

The Asia-Pacific Journal, Minamata Disease at Fifty. Disponível em: <<http://apjjf.org/-Shimbun-Asahi/2011/article.html>>. Acesso em 18 de junho de 2018.

TUBBS, R. R., et al. Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 77, p. 409-413, 1982.

UNEP Chemicals. Current exposure and impacts of mercury on human health. In: Global mercury assessment. Switzerland: UNEP, 2002. Disponível em: <http://www.chem.unep.ch/mercury/>

VALKO, M., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANHOUTTE, P. M., et al. Existence of multiple endothelium-derived hyperpolarizing factor (s)? In: VANHOUTTE P. M. (ed.). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Harwood Academic Publishers**, p. 303-305. 1999.

VANHOLDER, R. C., et al. Dissociation of glomerular filtration and renal blood flow in HgCl<sub>2</sub>-induced acute renal failure. **Kidney International**, v. 22, p.162–70, 1982.

VAN VLEET, T; SCHNELLMANN, R. Toxic nephropathy: environmental chemicals. **Seminars in Nephrology**, v. 23, p. 500–508, 2003.

VASSALLO, D. V., et al. Ações Tóxicas Agudas do Mercúrio sobre o Aparelho Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 67, p. 39-45, 1996.

VASSALLO, D. V., et al. Effects of mercury on the isolated heart muscle are prevented by DTT and cysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 156, p. 113-118, 1999.

VASSALLO, D.V., et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 939-946, 2011.

VÁZQUEZ, M., et al. Participation of divalent cation transporter DMT1 in the uptake of inorganic mercury. **Toxicology**, v. 331, p. 119-124, 2015.

VIRTANEN, J. K., et al. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 75-85, 2006.

WAKITA, Y. Hypertension induced by methyl mercury in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 89, p. 144-147, 1987.

WIGGERS, G. A., et al., Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **American Journal of Physiology**, v. 295, p. 1033–1043, 2008.



WOJCIECHOWSKI, J., et al. Cardiac and aortic lesions in chronic experimental poisoning with mercury vapors. **Polish Medical Science and History Bulletin**, v. 15, p. 255-260, 1975.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3 ed. Brasil: Guanabara Koogan, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria 101 Methylmercury**. Geneva. 1990, 1991, 1996.

YANAGISAWA, M., et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411–15, 1988.

ZALME, R. C., et al. Studies on the pathophysiology of acute renal failure. II. A histochemical study of the proximal tubule of the rat following administration of mercuric chloride. **Virchows Archiv. B, Cell Patholog**, v. 22, p. 197–216, 1976.

ZALUPS, R. K., et al. Intrarenal distribution of mercury in the rat: Effect of administered dose of mercuric chloride. **Bulletin Environment Contamination Toxicological**, v. 38, p 67–72, 1987.

ZALUPS, R. K. Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. **Toxicology**, v. 79, p. 215-228, 1993.

ZALUPS, R. K., et al. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 42, p. 1-44, 1994.

ZALUPS, R. K., et al. Accumulation and handling of inorganic mercury in the kidney after coadministration with glutathione. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 44, p. 385–99, 1995a.

ZALUPS, R. K., et al. Luminal and basolateral mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 46, p. 73–100, 1995b.

ZALUPS, R. K., et al. Binding of mercury in renal brush-border and basolateral membrane-vesicles. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1889–1900, 1997.

ZALUPS, R. K., et al. Participation of mercuric conjugates of cysteine, homocysteine, and N-acetylcysteine in mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, p. 551–61, 1998.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v. 2, p. 113-143, 2000.

ZALUPS, R. K., et al. Novel Hg<sup>2+</sup>-induced nephropathy in rats and mice lacking mrp2: Evidence of axial heterogeneity in the handling of Hg<sup>2+</sup> along the proximal tubule. **Toxicological Sciences**, v. 142, p. 250–60, 2014.

Net Nature, Quanto CO<sub>2</sub> um único vulcão pode emitir? Disponível em: <<https://netnature.wordpress.com/2017/09/13/quanto-co2-um-unico-vulcao-pode-emitir/>>. Acesso em 18 de junho de 2018.